



Analyse des propriétés antivirales des lymphocytes T Vgamma9Vdelta2 humains : potentiel immuno-thérapeutique au cours des infections par le cytomégalovirus humain

Charline Daguzan

► To cite this version:

Charline Daguzan. Analyse des propriétés antivirales des lymphocytes T Vgamma9Vdelta2 humains : potentiel immuno-thérapeutique au cours des infections par le cytomégalovirus humain. Immunologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2015. Français. NNT : 2015TOU30241 . tel-01391086

HAL Id: tel-01391086

<https://theses.hal.science/tel-01391086>

Submitted on 2 Nov 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Charline DAGUZAN

le mardi 15 décembre 2015

Titre :

Analyse des propriétés antivirales des lymphocytes
T V γ 9V δ 2 humains :
Potentiel immuno-thérapeutique au cours des infections par le
Cytomégalo virus humain

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Immunologie

Unité de recherche :

INSERM U1043 CPTP

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr. Eric CHAMPAGNE

Jury :

Dr. Julie DECHANET-MERVILLE, rapportrice

Dr. Philippe CLEZARDIN, rapporteur

Dr. Emmanuel SCOTET, rapporteur

Pr. Denis HUDRISIER, examinateur

Dr. Eric CHAMPAGNE, directeur de thèse

UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE-BIOTECHNOLOGIE
2015

THESE
Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE TOULOUSE III
Spécialité IMMUNOLOGIE ET MALADIES INFECTIEUSES

Charline DAGUZAN

**Analyse des propriétés antivirales des lymphocytes
T V γ 9V δ 2 humains :
Potentiel immuno-thérapeutique au cours des infections
par le Cytomégalovirus humain**

Directeur de thèse
Dr. Eric CHAMPAGNE

Rapporteurs
Dr. Philippe CLEZARDIN
Dr. Julie DECHANET-MERVILLE
Dr. Emmanuel SCOTET

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse : Les rapporteurs, le Dr **Philippe Clézardin**, le Dr **Julie Déchanet-Merville** et le Dr **Emmanuel Scotet** ainsi que le président du jury, le Pr **Denis Hudrisier**. Je vous remercie pour l'attention que vous avez portée à ce travail.

Ensuite, je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'équipe 8 :

Eric Champagne, comme tu l'as dit, nous avons eu des hauts et de nombreux bas dans nos recherches, mais dans l'ensemble la mission a été accomplie et le travail publié ! Merci pour m'avoir fait confiance durant ces trois années et pour m'avoir laissé une grande autonomie dans ce projet. Je te souhaite beaucoup de réussite dans tes projets futurs.

Christian Davrinche, je vous remercie de m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de votre équipe. Merci pour votre accueil si chaleureux et l'intérêt que vous avez porté à mon travail. Surtout, je tiens à vous remercier pour votre optimisme et vos encouragements même face à des résultats pas toujours positifs. J'en profite pour vous souhaiter une bonne retraite bien méritée !

Je tiens à remercier l'ensemble des chercheurs et professeurs de l'équipe qui m'ont toujours donné de bons conseils pour mener à bien ce projet : **Elmostafa Bahraoui**, **Stéphane Chavanas**, **Faouzi Lakhdar-Ghazal**. Un grand merci à **Nabila Jabrane-Ferrat**, pour ses conseils scientifiques mais également pour l'énorme soutien qu'elle m'a apporté durant cette dernière année de thèse.

Hélène, merci pour tout ! Je te remercie pour tous tes bons conseils techniques, pour ton écoute et ton soutien au quotidien. Merci aussi pour tous ces moments détentes et de rigolades ! Grâce à toi, j'ai remis à jour ma culture générale sur la variété française des années 80 (Nostalgie 🎵).

Je remercie également les doctorants actuels du laboratoire. **Jordi et Hugo**, je vous remercie d'avoir fermé les PSM en fin de journée quand j'en avais encore besoin ! Non blague à part, c'était très agréable de discuter et travailler avec vous. **Maude**, merci pour ces danses improvisées dans le labo (mais attention avec gants et blouses bleues de rigueur), et tes anecdotes bien marrantes. Je vous souhaite à tous les trois beaucoup de réussite et de publications scientifiques pour la suite, ainsi qu'à la nouvelle arrivée **Qian**.

Bien évidemment, durant 3 ans de thèse, on est amené à croiser les chemins d'autres personnes. Ainsi, je tiens à dire merci aux ex-membres de l'équipe 8 qui ont été présents à un moment donné durant ma thèse :

Un énorme merci à ma collègue ex-thésarde **Emeline** ! J'ai adoré nos nombreuses discussions professionnelles mais aussi culinaires et autres. Je te remercie aussi pour avoir répondu à mes nombreuses questions pratiques sur la préparation de la soutenance ! C'était un plaisir de t'avoir à côté durant cette thèse...

Je remercie également ma collègue de PSM **Frédérique**, en particulier pour sa bonne humeur légendaire ! Elle est même capable de venir au labo à 4h du matin avec le sourire... c'est pour vous dire.

Dans la catégorie des ex-thésards, je remercie également **Johan**. Merci pour tes nombreux bons conseils, mais aussi tes cours d'histoire (surtout sur Eisenhower, le 34^e président des Etats-Unis, né le 14 octobre 1890). C'était vraiment un plaisir de t'avoir rencontré durant cette thèse ! **Rémi**, je te remercie également et te souhaite bonne chance pour la suite.

Merci également à **Bernard Mariamé**, pour tout ce qu'il m'a appris en biologie moléculaire et également pour nos discussions sur nos Pyrénées à nous.

Je remercie aussi **Morgane** et **Manutea** à qui je souhaite bonne chance pour la suite. Enfin, je remercie également tous les membres de l'équipe qui sont à l'IFB.

Je tiens également à remercier les stagiaires qui ont travaillé sur ce projet. Un grand merci à **Manon**, malgré la tragique expérience des 70 tubes FACS étalés au sol... (Désolé tu as tellement bien travaillé durant ton stage qu'il fallait bien que je parle de cette histoire !). Je te souhaite beaucoup de bonheur et réussite pour ta thèse à Clermont-Ferrand, tu le mérites vraiment. Merci également à **Elodie** à qui je souhaite bonne chance pour la suite.

Le travail au CPTP ne peut fonctionner sans les services communs. Ainsi je remercie le service technique, le magasin, la gestion ... Un merci tout particulier à **Aline** pour sa gentillesse et sa générosité avec toutes ses petites sucreries qui tombent toujours à pic ! Grâce à toi mon cerveau a pu avoir son apport en glucose nécessaire pour fonctionner.

Durant ces 3 ans, j'ai eu la chance de pouvoir être monitrice à l'Université. Ainsi je remercie sincèrement **Denis** et **Cécile** pour m'avoir permis de réaliser cette expérience extrêmement enrichissante.

Bien évidemment cette thèse n'aurait pas été la même sans la ... **M2R Team** !

Un énorme merci à notre gersois **Lilian** ! Est-ce que vraiment j'en serai arrivé là sans toi ? Tu as toujours su bien me conseiller, me remotiver et m'encourager. On se connaît depuis maintenant de nombreuses années : de la licence au doctorat : 1^{er} stage découverte en L2 ensemble au CPTP → M2R ensemble → obtention de la bourse de thèse ensemble → monitorat ensemble → (désolé, mais je ne te suis pas au Canada, mais je viendrais en touriste bien sûr !). Je me rappelle encore de toi en TD de physio, tu étais le seul à comprendre le prof par moment ... Par contre, comprendre comment prendre un rond-point, ça c'est plus difficile... En tout cas, que de bons moments ensemble. C'était cool de partager ça avec un gersois qui répond (avec l'accent de chez nous) « Pareil ! » quand on lui propose un café... Mais surtout, qui se rend vite dispo pour le prendre ! Je te souhaite que du bonheur pour la suite au Canada et à ton retour également. Je suis convaincue que tu feras un EXCELLENT chercheur plus tard.

Un énorme merci à notre blonde charentaise, **Emilie** ! Grâce à toi : je sais maintenant designer des primers, j'ai découvert le Ragga Dancehall, et j'ai découvert également ta région, la Charente Maritime, à travers les paysages et ton patois étrange, je connais tous les sondages bizarres sur les français, j'aime presque les bouledogues français... C'était un plaisir de partager cette expérience avec toi car, pour une si petite personne, tu as plein de qualités

humaines et juste un seul petit, tout petit défaut : Mais à la fois, ce trait de ta personnalité nous a quand même permis de bien rire ! Je te souhaite beaucoup de réussite et de bonheur pour la suite sur le plan professionnel car tu les mérites vraiment.

Un énorme merci à notre rousse (ou blond vénitien ?) **Laure** ! Merci pour me comprendre quand on prend une photo et que je dis : « non pas de profil ! ». Je te remercie aussi d'avoir accepté de faire du squash avec moi et de continuer malgré que je ne sois plus au labo. Merci aussi pour ton écoute quand j'avais un souci et pour avoir été toujours présente pour faire les montages vidéo malgré l'heure. Alors maintenant, tu finis ton article, tu écris ta thèse, tu trouves un super post-doc à un endroit où je peux venir te voir, et tu reviens avec de gros papiers scientifiques !

Un énorme merci à notre petite (sauveuse de vie...) **Fanny** ! Merci pour tes pâtisseries, à toi et à Hervé, toutes les plus gourmandes les unes que les autres. Je te remercie pour ces bons moments de rigolades la journée... et le soir ! Merci d'avoir partagé avec moi cette question : « Pourquoi rentrer maintenant ? ». Je te souhaite également beaucoup de réussite pour la suite sur tous les plans !

Un énorme merci à notre maman du groupe, **Claire** ! Merci pour avoir joué les taxis quand j'avais soit un plâtre, soit une atèle... Je te remercie aussi pour toute la compassion que tu avais quand je t'écrivais : c'est horrible ça fait une heure que je suis dans les bouchons... Je te souhaite beaucoup de réussite et de bonheur pour la suite avec ta petite choupinette et ton mari !

Enfin je tiens à remercier tous les personnes avec qui j'ai pu discuter au sein du CPTP, allant de l'étage vert (équipe DGD, équipe JCG) au bâtiment F (les plateformes de cytométrie et microscopie). Il y en a un, dont je ne me rappelle pas le nom et qui, je crois, à gagner un prix à la SFI (Mathias, Mathieu ou **Régis** ?)...

Enfin je tiens à remercier mes **amis**, **ma famille** et **ma belle-famille** pour leur soutien et leurs encouragements. Un merci tout particulier pour ma **maman** et ses accents circonflexes ! Pour terminer, un énorme merci à **Mika**. Tu m'as toujours soutenue, encouragée et surtout tu as cru en moi, depuis le tout début de mes études, alors MERCI. Je te remercie également pour m'avoir bien fait changer les idées les week-ends de cette dernière année de thèse en me proposant des activités ludiques telles que la maçonnerie, la pose d'une charpente, l'étanchéité... Un grand MERCI à toi et notre MOB ! Cela m'a permis de me rendre compte que construire une maison ressemble fortement à un doctorat : on élabore un plan de travail, au fur et à mesure on l'améliore, parfois on se heurte à un problème (comme lorsqu'on trouve des gros cailloux dans le sable avec lequel on veut faire un crêpi, ou bien qu'on veut étudier la latence du HCMV), on trouve une solution (enlever les cailloux, étudier plutôt l'infection productive du HCMV) et au final, le papier est publié et la maison sur pied !

SOMMAIRE

RESUME	10
ABSTRACT	11
ABREVIATIONS	12
FIGURES ET TABLEAUX.....	14
INTRODUCTION	15
CHAPITRE 1 :LES LYMPHOCYTES T GAMMA DELTA.....	17
I. Les lymphocytes T $\gamma\delta$	18
A. Généralités	18
1. Découverte des T $\gamma\delta$	20
2. Différentes populations de T $\gamma\delta$ chez l'Homme et la souris.....	20
B. Répertoire des T $\gamma\delta$	21
C. Distribution tissulaire des T $\gamma\delta$	23
D. Modalités d'activation des T $\gamma\delta$	24
1. De multiples antigènes détectés.....	24
2. Régulation de l'activation	26
E. Fonctions effectrices des T $\gamma\delta$	28
1. Activité cytotoxique	28
2. Sécrétion de cytokines	28
II. Les lymphocytes T Vγ9Vδ2	30
A. Composés activant les lymphocytes T V γ 9V δ 2.....	30
1. Rôle majeur des Phosphoantigènes.....	30
a) Nature des Phosphoantigènes.....	30
b) Origine des Phosphoantigènes.....	31
2. Phosphoantigènes synthétiques.....	33
3. Les Aminobisphosphonates	34
a) Utilisation thérapeutique des bisphosphonates	34
b) Utilisation des ABP dans certaines pathologies cancéreuses	37
c) Traitement ABP: mode d'activation des T V γ 9V δ 2.....	37
4. Les Alkylamines	38
B. Mécanismes d'action des Phosphoantigènes	38
1. L'ecto-F1-ATPase	39
2. La Butyrophiline	40
a) Modèle allostérique.....	42
b) Modèle de présentation antigénique	43
a) 3 ^{ème} modèle	43
C. Régulation de l'activation des T V γ 9V δ 2	44
1. NKR	45
a) NKR inhibiteurs	45
b) NKR activateurs	45
2. TLR	46
3. Fc Récepteurs (FcR)	47

4. Molécules d'adhérence	47
D. Fonctions effectrices des TVγ9Vδ2	49
1. Immunité anti-tumorale.....	49
2. Rôle des T Vγ9Vδ2 face à des virus.....	52
a) Coronavirus	52
b) VIH	52
c) HCV.....	53
d) Virus de la grippe	54
e) EBV	54
CHAPITRE 2 :LE CYTOMEGALOVIRUS HUMAIN.....	57
I. Généralités sur le HCMV	58
A. Généralités	58
1. Historique.....	58
2. Classification.....	59
B. Epidémiologie	60
C. Pathologies associées aux infections HCMV.....	62
1. Infection d'individus sains immunocompétents.....	62
2. Infection d'individus immunodéprimés.....	62
a) Personnes transplantées d'organe solide	62
b) Personnes transplantées de cellules souches hématopoïétiques	62
c) Personnes infectées par le VIH.....	63
3. Infection congénitale et néonatale	63
4. Implication dans le cancer?.....	65
D. Traitements actuels et vaccination	65
E. HCMV et immunosénescence.....	66
F. Biologie du HCMV	68
1. Structure	68
a) Le génome viral	68
b) La capside	69
c) Le tégment.....	69
d) L'enveloppe virale.....	69
2. Cycle viral : Réplication et assemblage	70
3. Infection latente et réactivation.....	72
4. Les différentes souches virales HCMV.....	74
II. Réponses immunitaires anti-HCMV	75
A. Immunité innée	75
1. Reconnaissance du CMV via les PRR.....	76
2. Les cellules NK	77
3. Les lymphocytes T γδ.....	79
B. Immunité adaptative	82
1. Réponses humorales	82
2. Réponses cellulaires	83
a) Les lymphocytes T CD8 ⁺	84
b) Les lymphocytes T CD4 ⁺	85
c) Les lymphocytes T régulateurs	86
III. Mécanismes d'échappement du HCMV au système immunitaire.....	88
A. Echappement virale à l'immunité innée.....	88
1. Modulation des récepteurs inhibiteurs des cellules NK.....	88

2. <i>Modulation des récepteurs activateurs des cellules NK</i>	89
B. Immunité adaptative : modulation de la présentation antigénique	90
1. <i>Baisse d'expression du CMH-I</i>	90
2. <i>Baisse d'expression du CMH-II</i>	91
3. <i>Intérêt physiologique</i>	92
C. Latence du HCMV	93
OBJECTIFS DU PROJET	95
RESULTATS	99
PUBLICATION SOUMISE EN JUILLET 2015	101
RESULTATS SUPPLEMENTAIRES	139
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	145
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	155

RESUME

Le traitement de cellules par des aminobisphosphonates (ABP) induit une accumulation intracellulaire de molécules activatrices des lymphocytes T V γ 9V δ 2 (IPP, Apppl). Alors que ces lymphocytes ne semblent pas naturellement activés lors d'une infection par le cytomégalovirus humain (HCMV), le laboratoire a mis en évidence l'existence d'une action synergique entre le HCMV et les ABP sur leur activation. Ma thèse a eu pour objectif d'analyser le mécanisme de cette synergie et d'évaluer le potentiel immuno-thérapeutique des ABP dans le cadre d'une infection HCMV.

Nous avons montré qu'après sensibilisation par des ABP *in vitro*, des cellules infectées sont fortement activatrices des T V γ 9V δ 2. Les fibroblastes traités par des ABP activent la production d'IFN- γ par les T V γ 9V δ 2 mais pas la production de TNF. L'infection de ces fibroblastes par le HCMV induit une augmentation de la production d'IFN- γ et stimule la production de TNF par des T V γ 9V δ 2. Cette activation a été observée avec des lymphocytes T V γ 9V δ 2 établis en lignées cellulaires mais aussi avec des cellules V γ 9V δ 2 isolées directement de sang périphérique. De plus, cette augmentation de production de cytokines est observée avec différentes souches virales (souche de laboratoire et isolats cliniques) et différents types cellulaires permissifs pour HCMV. Nous avons également montré que l'infection par le HCMV entraîne une surproduction d'IPP et d'Apppl dans les cellules cibles traitées aux ABP, ce qui explique en partie l'augmentation de la sécrétion de cytokines par les T V γ 9V δ 2. Enfin, nous avons mis en évidence que ces T V γ 9V δ 2 sont capables de limiter la réplication et la production virale suite à un traitement par des ABP, tout en préservant les cellules non infectées. Selon nos études, cette activité antivirale implique la production des cytokines IFN- γ et TNF et non l'activité cytotoxique des T V γ 9V δ 2.

Par conséquent, mes travaux de thèse fournissent une preuve de concept pour une application thérapeutique des ABP dans le cadre d'une infection par le HCMV.

ABSTRACT

Aminobisphosphonates (ABP) treatment of cells induces intracellular accumulation of molecules (IPP, Apppl) which stimulate human V γ 9V δ 2 T cells. Although these lymphocytes do not appear naturally activated during human cytomegalovirus (HCMV) infection, the laboratory demonstrated a synergistic effect of HCMV and ABP on V γ 9V δ 2 T cell activation. My PhD thesis aimed to analyze the mechanism of this synergy and evaluate the immunotherapeutic potential of ABP in the context of HCMV infection.

After ABP treatment of cells *in vitro*, we showed that HCMV-infected cells strongly activated V γ 9V δ 2 T cells. ABP-treated fibroblasts activate V γ 9V δ 2 T cells to produce IFN- γ but not TNF. The HCMV infection of these fibroblasts stimulates TNF secretion and an increased production of IFN- γ , indicating that V γ 9V δ 2 cells can sense HCMV infection. Increased cytokine production was observed with V γ 9V δ 2 T cell lines and “fresh” V γ 9V δ 2 directly isolated of blood. Moreover, V γ 9V δ 2 T cell activation was observed with most HCMV strains (laboratory strains or clinical isolates) and different HCMV-permissive cells. We also showed that HCMV infection induces an overproduction of IPP and Apppl in ABP-treated cells, which explains in part the increased cytokine production by V γ 9V δ 2 T cells. At last, we demonstrated the capacity of V γ 9V δ 2 T cells to limit viral replication and production after ABP treatment while preserving uninfected cells. Our experiments indicate that this antiviral activity involves IFN- γ and TNF secretion by V γ 9V δ 2 T cells but not their cytotoxicity activity.

Consequently, my work provides a proof of concept of the therapeutic potential of ABP in the context of HCMV infection.

ABREVIATIONS

ABP : Aminobisphosphonates

Apppl : Gamma-P-(3-méthyl-but-3-en-1-yl)-5'-adénosine disodium triphosphate

BP : Bisphosphonates

BTN : Butyrophiline

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité (de classe I ou II)

DETC : Cellule T dendritique épidermique

DMAPP : Dyméthylallyl pyrophosphate

DNAM-1/CD226 : DNAX accessory molecule-1

DOXP : 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate

EBV : virus d'Epstein-Barr

EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

EPCR : Endothelial protein C receptor

FcR : Récepteur au Fc des immunoglobulines

FPPS : Farnésyl Pyrophosphate Synthase

gB : glycoprotéine B

HCMV : Cytomégalovirus humain

HCV : Virus de l'hépatite C

HDMAPP/ HMBPP : Hydroxy-diméthylallyl pyrophosphate /(E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate

HLA : Human leukocyte antigen

HSPG : protéoglycanes à héparane sulfate

ICAM : Intercellular adhesion molecule 1

IE : Immediate Early

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobulines

ILT2/LIR-1 : immunoglobuline like transcript 2

IPP : Isopentenyl-pyrophosphate

KIR : Killer-cell immunoglobulin-like receptors

LFA-1 : Lymphocyte function-associated antigen 1

MCMV : Cytomégalo­virus murin

MEP : Méthylérythritol phosphate

MIC : Major histocompatibility complex class I-related chain A

MI­EP: promoteur *Major Immediate Early Promotor*

MVA : Mévalonate

NABP : Non-aminobisphosphonate

NCR : Natural cytotoxicity receptors

NK : cellules Natural Killer

NKR : Natural Killer Receptor

ORF : Open Reading Frame

P-Ag : Phosphoantigènes

PAMP/DAMP: Pathogen/Damage Associated Molecular Patterns

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PRR: Pattern Recognition Receptors

RE : Réticulum Endoplasmique

SIDA : syndrome de l'immunodéficience acquise

T $\alpha\beta$: Lymphocytes T conventionnels $\alpha\beta$

T $\gamma\delta$: Lymphocytes T $\gamma\delta$

T CD4+ : Lymphocytes T CD4+

T CD8+ : Lymphocytes T CD8+

T V δ 2neg : lymphocytes T V δ 2 négatives

T V γ 9V δ 2 : lymphocytes T V γ 9V δ 2

TCR : T Cell Receptor (récepteur T à l'antigène)

Th : Lymphocytes T helper

TLR : Toll-Like Receptors

TNF : Tumor Necrosis Factor

TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand

TUBag : Tuberculosis Antigen

UL : Région longue unique du HCMV

ULBP: UL16 binding protein

US : Région courte unique

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

FIGURES ET TABLEAUX

- Figure 1** : Les T $\gamma\delta$ sont à l'interface entre l'immunité innée et adaptative
- Figure 2** : Structure tridimensionnelle du TCR $\gamma\delta$
- Figure 3** : Reconnaissance d'une cellule cible par les T $\gamma\delta$
- Figure 4** : Les différents profils cytokiniques des T $\gamma\delta$
- Figure 5** : Structures des Phosphoantigènes naturels
- Figure 6** : Les voies de biosynthèse du cholestérol DOXP/MEP et MVA induisent une production de P-Ags.
- Figure 7** : Structures des Phosphoantigènes synthétiques
- Figure 8** : Structures des aminobisphosphonates
- Figure 9** : Voie du mévalonate
- Figure 10** : Modèle hypothétique d'activation des T V γ 9V δ 2
- Figure 11** : Structure de la BTN3
- Figure 12** : Les différents modèles proposés impliquant la BTN3A1 dans l'activation des T V γ 9V δ 2
- Figure 13** : Les différents récepteurs impliqués dans la régulation de l'activation des T V γ 9V δ 2
- Figure 14** : Stratégies d'immunothérapie anticancéreuse utilisant les T V γ 9V δ 2
- Figure 15** : Inclusions nucléaires de fibroblastes infectés
- Figure 16** : Manifestations cliniques d'une infection HCMV
- Figure 17** : Le HCMV
- Figure 18** : Mécanisme d'entrée du HCMV par fusion membranaire
- Figure 19** : Cycle viral lytique du HCMV
- Figure 20** : Régulation de la réactivation et de la latence par des mécanismes épigénétiques
- Figure 21** : L'activation des TLR par les herpesvirus
- Figure 22** : Effets directs et indirects des T V δ 2neg induit lors d'une infection par HCMV, *in vivo* et *in vitro*
- Figure 23** : Contrôle du HCMV par l'immunité innée et adaptative
- Figure 24** : Reconnaissance de protéines HCMV par les cellules NK
- Figure 25** : Diminution d'expression des ligands du NKG2D par UL16
- Figure 26** : Diminution d'expression des molécules de CMH-I par le HCMV
- Figure 27** : Effets majeurs des immunoévasines du HCMV
- Figure 28** : Rôle de la BTN3A1 dans l'activation des T V γ 9V δ 2 suite à une infection HCMV
- Figure 29** : Expression de la BTN3A1 sur des fibroblastes MRC-5 infectés par HCMV
- Figure 30** : Sécrétion de cytokines par les T V γ 9V δ 2 en présence de cellules infectées et chargées en HDMAPP
- Figure 31** : Quels sont le ou les signaux induits par l'infection HCMV, en synergie avec le traitement ABP, qui sont nécessaires à l'activation des T V γ 9V δ 2 ?
- Tableau 1** : Nomenclature des lymphocytes T murins et humains
- Tableau 2** : TCR $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ des lymphocytes T murins et humains:
- Tableau 3** : Distribution des différentes populations de T $\gamma\delta$ chez la souris et chez l'Homme
- Tableau 4** : Les différents ligands des T $\gamma\delta$ humains et murins
- Tableau 5** : Classification des Herpesvirus

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 :

Les lymphocytes T $\gamma\delta$

I. Les lymphocytes T $\gamma\delta$

A. Généralités

Lors de l'intrusion d'un agent pathogène dans l'organisme, une réponse immunitaire innée se met rapidement en place, faisant intervenir des cellules présentes sur le site infectieux. Durant les jours suivant cette infection, une réponse adaptative se développe faisant intervenir des lymphocytes B ainsi que des lymphocytes T, présents dans les organes lymphoïdes drainant le site infectieux. Ces lymphocytes ainsi activés ont pour particularité d'être spécifiques d'antigènes présents sur l'agent pathogène.

Il existe différentes sous-populations de lymphocytes T : les lymphocytes T dits « conventionnels » exprimant un TCR $\alpha\beta$ (T $\alpha\beta$) et les lymphocytes T dits « non conventionnels ». Les lymphocytes T conventionnels reconnaissent des peptides antigéniques présentés par des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) classiques de classe I (CMH-I) ou II (CMH-II) et expriment les corécepteurs CD4 ou CD8 respectivement. Ces cellules sont les lymphocytes T CD4+ (T CD4+) qui sécrètent des cytokines modulant l'activité d'autres cellules immunitaires, et les lymphocytes T CD8+ (T CD8+) ayant des propriétés cytotoxiques. Les lymphocytes T non conventionnels, quant à eux, reconnaissent des antigènes non présentés par les molécules de CMH classiques, et n'expriment généralement pas de corécepteurs CD4 ou CD8, contrairement aux T conventionnels. Parmi ces lymphocytes T non conventionnels, certaines populations expriment un TCR $\alpha\beta$ (les Natural Killer T et les T invariants associés aux muqueuses) tandis qu'une autre population exprime un TCR (T Cell Receptor) composé des chaînes γ et δ : les lymphocytes T $\gamma\delta$ (T $\gamma\delta$). Dans cette introduction, nous nous focaliserons sur les caractéristiques des T $\gamma\delta$ qui concernent directement nos travaux.

Les T $\gamma\delta$ sont souvent classés à l'interface entre l'immunité innée et adaptative (**Figure 1**). En effet, leur multiplication rapide, le développement de fonctions effectrices qui ne nécessite pas de sélection clonale, ainsi que leurs mécanismes de reconnaissance antigénique leur confèrent des caractéristiques de l'immunité innée. A l'inverse, la structure et le réarrangement de leur TCR confèrent à ces cellules certaines caractéristiques de l'immunité adaptative.

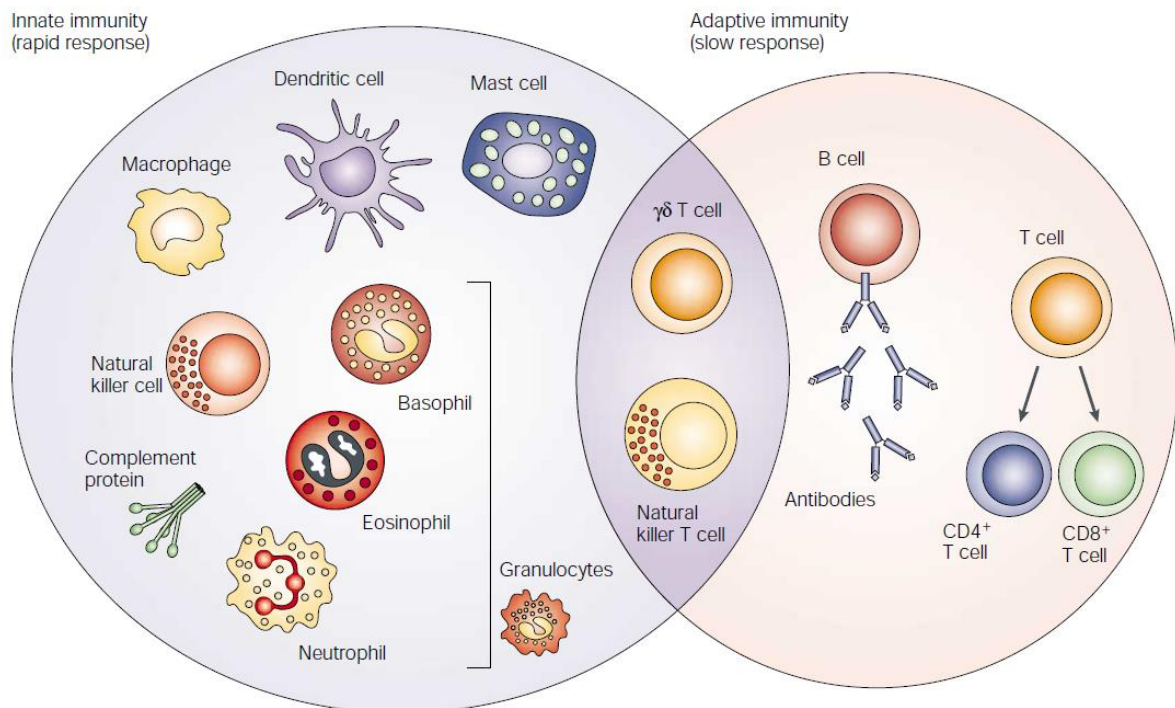


Figure 1 : Les T $\gamma\delta$ sont à l'interface entre l'immunité innée et adaptative (Dranoff, 2004).

Les T $\gamma\delta$ interviennent dans les premières lignes de défense face à une infection, contrairement aux T $\alpha\beta$ conventionnels. Cette activation rapide des T $\gamma\delta$ s'explique par un ensemble de mécanismes :

- La localisation principalement tissulaire des T $\gamma\delta$ leur permet de pouvoir rapidement détecter *in situ* les cellules infectées ou tumorales, contrairement aux T $\alpha\beta$ localisés dans les organes lymphoïdes secondaires. Ces cellules peuvent représenter jusqu'à 70% des lymphocytes présents.
- Des sous-populations de T $\gamma\delta$ sont capables de reconnaître directement les cellules infectées ou tumorales sans préalable présentation d'antigènes apprêtés par des cellules présentatrices d'antigènes.
- Leur fréquence est élevée ce qui fait que leur stimulation ne nécessite pas de sélection ou d'expansion clonale forte pour répondre de façon efficace à l'infection ou au stress.

Par conséquent, ces cellules font partie des premières cellules de l'immunité à être activées lors de l'intrusion d'un agent pathogène.

1. Découverte des T $\gamma\delta$

Il y a plusieurs dizaines d'années, une des populations de lymphocytes T non conventionnels, les lymphocytes T $\gamma\delta$, a été découverte. Dans les années 80, suite à l'identification des gènes codant les immunoglobulines, plusieurs équipes de recherche ont cherché à identifier les gènes codant pour le TCR des lymphocytes T. L'une d'entre elle a identifié un transcrit dans le thymus de souris qui correspond à la chaîne γ du TCR (Saito et al., 1984). En 1987, Chien et ses collaborateurs ont mis en évidence une nouvelle région localisée dans le locus de la chaîne α du TCR qui semble être réarrangé plus précocement durant le développement thymique des lymphocytes (Chien et al., 1987). La caractérisation de ce locus a permis de découvrir un nouveau segment du TCR : la chaîne δ . C'est ainsi que l'identification d'une chaîne γ et δ du TCR a permis de mettre en évidence une nouvelle sous-population de lymphocytes T : Les T $\gamma\delta$.

2. Différentes populations de T $\gamma\delta$ chez l'Homme et la souris

Il est important de noter que les différentes populations de T $\gamma\delta$ (caractérisées par la nature des parties variables, V, de leur chaîne γ et δ de leur TCR) présents chez l'Homme et la souris sont différentes. En effet, il n'existe pas forcément de correspondance entre ces deux espèces et leur TCR. Par exemple, la population T V γ 5V δ 1 (aussi appelés T dendritiques épidermiques, DETC) présente dans l'épiderme des souris n'existe pas chez l'Homme, et les T V γ 9V δ 2 localisés dans la circulation sanguine chez l'Homme sont propres aux primates supérieurs.

Chaque population peut avoir des caractéristiques différentes en ce qui concerne l'activation, la différenciation, les cytokines produites et l'activité cytotoxique. De plus, cette complexité est encore accentuée par les différentes nomenclatures utilisées pour identifier les différents TCR (clones γ et δ) (**Tableau 1**).

Table 1. Nomenclature for murine V γ gene segments

Official designation ^a	Heilig and Tonegawa [2]	Garmen et al. [5]
TCRGV1S1	V γ 5	V γ 3
TCRGV2S1	V γ 6	V γ 4
TCRGV3S1	V γ 4	V γ 2
TCRGV4S1	V γ 7	V γ 5
TCRGV5S1	V γ 1	V γ 1.1
TCRGV5S2	V γ 2	V γ 1.2
TCRGV5S3	V γ 3	V γ 1.3

In the proposed official designation, TCR refers to T cell receptor; G refers to γ ; V to variable; 1 to the allocated number for the particular V region family (in this case, numbers 1–5 are based on increasing distance from J γ); S refers to the designation of a V segment as a member of the family.

^a WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee on TCR Designation 1995 [3, 4].

Table 3. Nomenclature for human V γ gene segments

Official designation ^a	Lefranc et al. [24] Foster et al. [25]	Strauss et al. [26] Quertermous et al. [27]
TCRGV1S1P	V γ 1	V γ 1.1 pseudogene
TCRGV1S2	V γ 2	V γ 1.2
TCRGV1S3	V γ 3	V γ 1.3
TCRGV1S4	V γ 4	V γ 1.4
TCRGV1S5	V γ 5	V γ 1.5
TCRGV1S5P	V γ 5P	V γ 1.5 pseudogene
TCRGV1S6P	V γ 6P	V γ 1.6 pseudogene
TCRGV1S7P	V γ 7P	V γ 1.7 pseudogene
TCRGV1S8	V γ 8	V γ 1.8
TCRGV2S1	V γ 9	V γ 2
TCRGV3S1P	V γ 10	V γ 3
TCRGV4S1P	V γ 11	V γ 4
TCRGV5S1P	VA	VA pseudogene
TCRGV6S1P	VB	VB pseudogene

See footnote to table 1 for basis of official designation. In addition, P refers to pseudogene.

^a WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee on TCR Designation 1995 [3, 23].

Tableau 1 : Nomenclature des lymphocytes T murins et humains (Bergstresser and Takashima, 2001).

B. Répertoire des T $\gamma\delta$

Tout comme les autres lymphocytes T non conventionnels, les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont caractérisés par l'expression d'un TCR réarrangé qui reconnaît des antigènes du soi et du non soi en absence de présentation par les molécules de CMH-I et II classiques. Comme leur nom l'indique, les T $\gamma\delta$ expriment un TCR sous forme d'hétérodimère TCR γ /TCR δ lié au complexe CD3. De façon semblable aux T $\alpha\beta$ conventionnels, chaque chaîne du TCR est constituée d'une partie variable (V) et d'une partie constante (C). Les mécanismes de recombinaisons concernant les deux chaînes sont globalement les mêmes que ceux décrits chez les T $\alpha\beta$. Ainsi la diversité du TCR est générée par la recombinaison : des segments V (Variable), D (Diversité) et J (Jonctionnel) pour la chaîne δ et des segments V et J pour la chaîne γ , de façon semblable à ce qui est obtenu avec les chaînes β et α respectivement. Cependant, chez l'Homme, les T $\gamma\delta$ ont un répertoire restreint de gènes des segments V comparé à celui des T $\alpha\beta$ conventionnels. Il existe seulement 6 gènes V γ fonctionnels dont 5 appartiennent à la famille V γ I (V γ 2, 3, 4, 5, 8) et le dernier (V γ 9) appartient à la famille V γ II (**Tableau 2**). Le nombre de gènes fonctionnels V δ est aussi faible comparé à ceux de la chaîne β . Malgré cela, la diversité combinatoire théorique des T $\gamma\delta$ (environ 10^{20}) serait plus élevée que celle des T $\alpha\beta$ (environ 10^{15}). Ce phénomène serait dû principalement à leur capacité d'utiliser de multiples copies en tandem de gènes D ainsi qu'à générer une diversité jonctionnelle (insertion ou la

délétion de nucléotides) plus élevée créant ainsi une forte diversité dans la partie CDR3 (Complementary determining region 3) de la chaîne δ (Carding and Egan, 2002).

Cependant la réalité est différente de la théorie car cette diversité des T $\gamma\delta$ est nettement moins élevée. En effet, des associations préférentielles entre les chaînes γ et les chaînes δ (porteuses de régions $V\gamma$ ou $V\delta$ particulières) ont lieu durant le développement des T $\gamma\delta$. Par exemple, chez l'Homme, la chaîne $V\gamma 9$ s'associe exclusivement avec la chaîne $V\delta 2$ tandis que les autres chaînes $V\gamma$ (2, 3, 4, 5 et 8) peuvent s'associer à la chaîne $V\delta 1$.

$\gamma\delta$ Segments			$\alpha\beta$ Segments		
	Mouse	Human		Mouse	Human
$V\delta$	11	3	$V\alpha$	23	41
$D\delta$	2	3	$J\alpha$	61	61
$J\delta$	2	4			
			$V\beta$	31	30
$V\gamma$	7	5	$D\beta$	2	2
$J\gamma$	4	3	$J\beta$	14	14

¹Total number of genes that are available for recombination for both mouse and human TCRs.

Tableau 2 : TCR $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ des lymphocytes T murins et humains: Nombre de gènes de la partie variable (V) des chaînes α , β , γ et δ du TCR des lymphocytes T chez la souris et chez l'Homme (Girardi, 2006).

La structure tridimensionnelle du TCR $\gamma\delta$ est également différente de celle du TCR $\alpha\beta$. L'angle formé entre les domaines C et V est plus prononcé dans un TCR $\gamma\delta$ que dans un TCR $\alpha\beta$, ce qui a pour conséquence qu'il ressemble davantage, d'un point de vue structurel, au fragment Fab d'une immunoglobuline (Ig) (**Figure 2**). Ainsi, les T $\gamma\delta$ possèdent un TCR ayant une structure particulière probablement en rapport avec la nature des complexes antigéniques reconnus (voir partie D.).

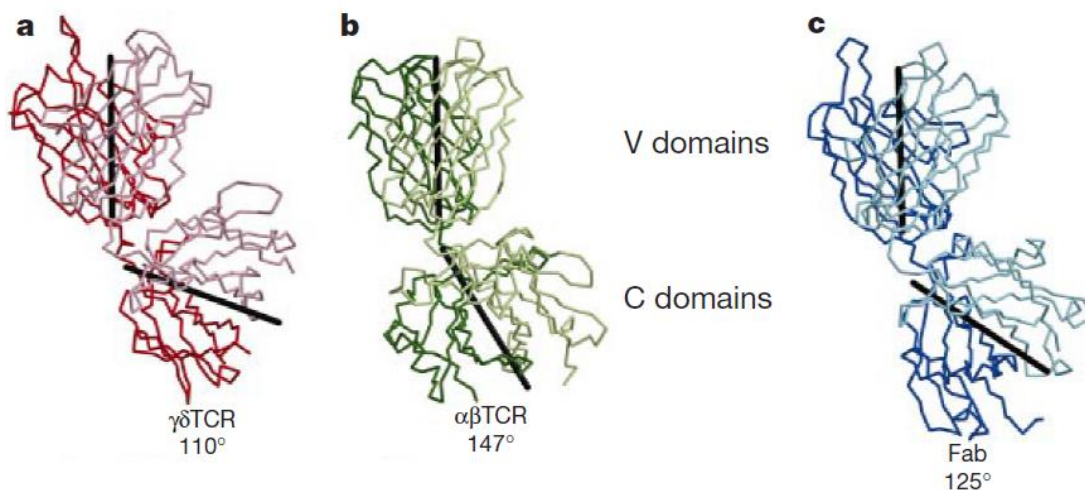


Figure 2 : Structure tridimensionnelle du TCR $\gamma\delta$: Structure d'un TCR $\gamma\delta$ humain type V γ 9V δ 2 (clone G115) (a), d'un TCR $\alpha\beta$ (b) et de la partie Fab d'une immunoglobuline (c). Les traits noirs représentent l'angle formé entre les domaines C et V (Allison et al., 2001).

C. Distribution tissulaire des T $\gamma\delta$

Contrairement aux T $\alpha\beta$, les T $\gamma\delta$ sont davantage présents en périphérie et représentent une forte proportion des lymphocytes dans les tissus tels que le derme et les muqueuses du tractus digestif et génital.

Chez l'Homme, les T $\gamma\delta$ représentent 0.5 à 16% des lymphocytes dans le sang périphérique et dans les organes lymphoïdes tels que le thymus, les amygdales, les ganglions lymphatiques et la rate. Ces cellules sont plus fortement présentes dans l'épiderme et les muqueuses. Ainsi, elles peuvent représenter jusqu'à 30% des lymphocytes dans l'intestin. Chez la souris, 1 à 4% des lymphocytes T dans le thymus et les organes lymphoïdes secondaires sont des T $\gamma\delta$ et ceux-ci peuvent représenter jusqu'à 40% des lymphocytes dans l'intestin et 70% dans le derme.

Les T $\gamma\delta$ ont une expression tissulaire qui varie selon les différentes populations caractérisées par la nature des parties variables de leur chaîne γ et δ de leur TCR. Il existe principalement 3 populations chez l'Homme : les T V δ 1, V δ 2 et V δ 3. Les T $\gamma\delta$ majoritairement présents dans le sang sont les T V γ 9V δ 2 (50 à 95% des T $\gamma\delta$), sous-population absente chez la souris. De plus, les T V δ 1 et V δ 3 humains sont majoritairement présents dans les tissus et organes tels que le thymus, la rate, le foie, les tractus génitaux et l'épithélium intestinal. Le derme, quant à lui, est principalement constitué de T V δ 1. Chez la souris, les T $\gamma\delta$ sont

présents dans la rate (V δ 1 et V δ 4), dans la peau et l'épithélium intestinal (V γ 7V δ 4, V γ 7V δ 5 et V γ 7V δ 6), dans l'épithélium pulmonaire (V γ 4 et V γ 6), et dans les organes reproducteurs (V γ 6V δ 1). De plus, chez les souris on retrouve une population de T $\gamma\delta$ présente dans l'épiderme, inexistante chez l'Homme, qui sont les T V γ 5V δ 1 (DETC) (**Tableau 3**) (Lafont et al., 2014).

Species	Peripheral location	Predominant V gene segment usage	V(D)J diversity
Mouse	Adult thymus	Diverse	High
	Spleen	V γ 1 and V γ 4	High
	Lymph nodes	Diverse	High
	Epidermis	V γ 5V δ 1	Invariant
	Liver	V γ 1V δ 6.3, V γ 4 and V γ 6	Intermediate
	Gut epithelia	V γ 7V δ 4, V γ 7V δ 5 and V γ 7V δ 6	Intermediate
	Uterovaginal epithelia	V γ 6V δ 1	Invariant
	Lung epithelia	V γ 4 and V γ 6	Intermediate
Human	Thymus	V δ 1	High
	Peripheral blood	V γ 9V δ 2	Intermediate
	Spleen	V δ 1	High
	Liver	V δ 1 and V δ 3	High
	Gut epithelia	V δ 1 and V δ 3	High
	Dermis	V δ 1	High

Tableau 3 : Distribution des différentes populations de T $\gamma\delta$ chez la souris et chez l'Homme. Pour chaque population de T $\gamma\delta$ murins ou humains caractérisée par leur TCR, est indiqué leur localisation dans différents organes, tissus ou muqueuses et leur niveau de diversité de V(D)J (Bonneville et al., 2010).

D. Modalités d'activation des T $\gamma\delta$

1. De multiples antigènes détectés

L'activation des T $\alpha\beta$ conventionnels nécessite une reconnaissance de peptides antigéniques par leur TCR. L'activation des T $\gamma\delta$ nécessite aussi d'une stimulation de leur TCR mais avec des antigènes de natures différentes et diverses : des antigènes protéiques, des lipides exogènes ou endogènes associés à des molécules apparentées au CMH (CD1c et CD1d) (Luoma et al., 2013), ou bien encore des composés phosphorylés exogènes ou endogènes nommés phosphoantigènes (P-Ags). Ainsi, il a été identifié pour chaque population de T $\gamma\delta$, différents types d'antigènes qui sont résumés dans le **tableau 4**. Les T $\gamma\delta$ perçoivent ainsi principalement des signaux induits lors d'un stress cellulaire tel que la transformation tumorale ou l'infection par un agent pathogène. De plus, une des différences notable entre les

T $\alpha\beta$ et les T $\gamma\delta$ est que ces derniers ne reconnaissent pas des antigènes apprêtés mais des antigènes sous forme native.

	Populations T $\gamma\delta$	Antigènes
Humains	V δ 1	MICA
	V δ 1 (clones)	CD1c
	V δ 1 (sang)	Tétramères CD1d chargés avec sulphatides
	V δ 1	Lipohexapeptides
	V δ 2	ULBP4
	V γ 9V δ 2	Phosphoantigènes
	V γ 4V δ 5 (clones)	EPCR
	V γ 1.3V δ 2	Histidyl-tRNA synthase
	Plusieurs populations	Phycoerythrine
Souris	V γ 2V δ 5 (clones)	I-E ^K
	V γ 2V δ 8 (clones)	HSV glycoprotein I
	V γ 1 (clones)	Cardiolipine, apolipoprotéine H
	V γ 1 (clones)	Peptide insuline
	Plusieurs populations	H2-T10, H2-T22
	Plusieurs populations	Phycoerythrine

Tableau 4 : Les différents ligands des T $\gamma\delta$ humains et murins. Modifié d'après (Vantourout and Hayday, 2013).

Des populations de T $\gamma\delta$ peuvent reconnaître des molécules de CMH tels que les I-E^K par les T V γ 2V δ 5 murins et H2-T10 ou H2-T22 par des différents clones de T $\gamma\delta$ murins (Matis et al., 1989). Des molécules apparentées à celles-ci telles que MICA (Major histocompatibility complex class I-related chain A), ULBP (UL16 binding protein), CD1d et CD1c peuvent aussi être reconnues par des T $\gamma\delta$ humains (V δ 1). Récemment, il a été mis en évidence la reconnaissance d'une protéine transmembranaire de type 1 homologue des molécules du CMH-I/CD1, le récepteur EPCR (endothelial protein C receptor) par les T V γ 4V δ 5 humains (Willcox et al., 2012). D'autres antigènes apparaissent comme étant des cibles uniques des T $\gamma\delta$ telles que les P-Ags endogènes qui ont une structure similaire à celles des isoprénoïdes et qui sont impliqués dans l'activation des T V γ 9V δ 2.

Les modalités de reconnaissance antigénique des différentes populations de T $\gamma\delta$ par leur TCR ne sont toujours pas claires à l'heure actuelle, malgré de nombreuses études menées sur l'interaction TCR-ligand. De plus, la reconnaissance des antigènes varie en fonction des populations de T $\gamma\delta$, ce qui complexifie l'étude de cette interaction.

2. Régulation de l'activation

Nous venons de voir que les T $\gamma\delta$ peuvent parfois reconnaître, via leur TCR, des antigènes du soi tels que les molécules de CMH. Par conséquent, l'activation de ces cellules nécessite une régulation importante afin de limiter les risques d'auto-immunité et de discriminer ainsi des cellules saines à des cellules infectées ou tumorales. Ainsi, les T $\gamma\delta$ perçoivent des signaux induits lors d'un stress cellulaire par des récepteurs autres que le TCR et dont l'expression varie en fonction des différentes populations de T $\gamma\delta$. Ces récepteurs induisent des signaux activateurs ou inhibiteurs, ce qui permet de réguler de façon positive ou négative les différentes fonctions effectrices de ces cellules. Ainsi, l'activation des T $\gamma\delta$ est le résultat de l'intégration de signaux activateurs et/ou inhibiteurs qui agissent en synergie (**Figure 3**).

En effet, ces cellules possèdent des *Pattern Recognition Receptors* (PRR). Il existe différentes classes de PRR impliquées dans la détection de différents types d'agents pathogènes (bactéries, virus ...) à l'origine de l'initiation de la réponse immunitaire. Ces récepteurs reconnaissent des motifs communs exprimés par différents types d'agents pathogènes (PAMPs). Les *Toll-Like Receptors* (TLR) sont une classe de PRR transmembranaires capables de reconnaître une grande variété d'agents pathogènes. Les *Nucleotide Oligomerization Domain Receptors* (NLR) sont, quant à eux, une classe de PRR cytoplasmiques également capables de reconnaître différents types de pathogènes. Cette reconnaissance active des voies de signalisation qui dépendent ou pas de la molécule MyD88 menant à la transcription de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-8 ou TNF) et/ou d'interféron de type I (IFN α/β). Ainsi, les T $\gamma\delta$ expriment des TLR ou NLR, impliqués dans la reconnaissance de motifs PAMPs qui sont exprimés par différents types d'agents pathogènes (Dar et al., 2014).

Les T $\gamma\delta$ expriment aussi des *Natural Killer Receptors* (NKR), initialement décrits sur les cellules NK, pouvant induire un signal inhibiteur ou activateur. Par exemple, le récepteur activateur NKG2D a un rôle important dans la reconnaissance de cellules tumorales ou infectées (Rincon-Orozco et al., 2005). Certains T $\gamma\delta$ expriment aussi des récepteurs appartenant à la famille des récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR) tels que NKp30, NKp44 ou NKp46 dont la stimulation induit des signaux activateurs. D'autres types de récepteurs sont exprimés par ces cellules telles que les récepteurs aux fragments Fc des Ig (Fc γ RIIIA /CD16) et des molécules d'adhérence. Ces dernières ont un rôle important dans l'activation des T $\gamma\delta$ car elles permettent le maintien du contact entre la cellule cible et ces lymphocytes. Ainsi la molécule d'adhérence LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen 1) exprimée à la

surface des T V γ 9V δ 2 humains participe à l'activation de ces dernières par liaison à la molécule ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule 1) sur les cellules cibles (Kato et al., 2003).

Il est généralement admis que la stimulation de leur TCR est nécessaire pour l'activation des T $\gamma\delta$. Cependant, pour certains récepteurs comme le NKG2D, le rôle n'est pas encore clair. En effet, la stimulation du NKG2D, qui fonctionne généralement de façon synergique avec le TCR, peut induire une activité cytotoxique par les T V γ 5V δ 1 murins ou bien par les T V γ 9V δ 2 humains contre des cellules tumorales, parfois sans engagement du TCR (Girardi et al., 2001; Qin et al., 2009). Cependant, les autres récepteurs sont en général incapables d'activer les T $\gamma\delta$ sans signal TCR.

Nous verrons dans la partie II.D, le rôle de ces différents récepteurs dans l'activation de la population qui nous intéresse pour la suite, les T V γ 9V δ 2.

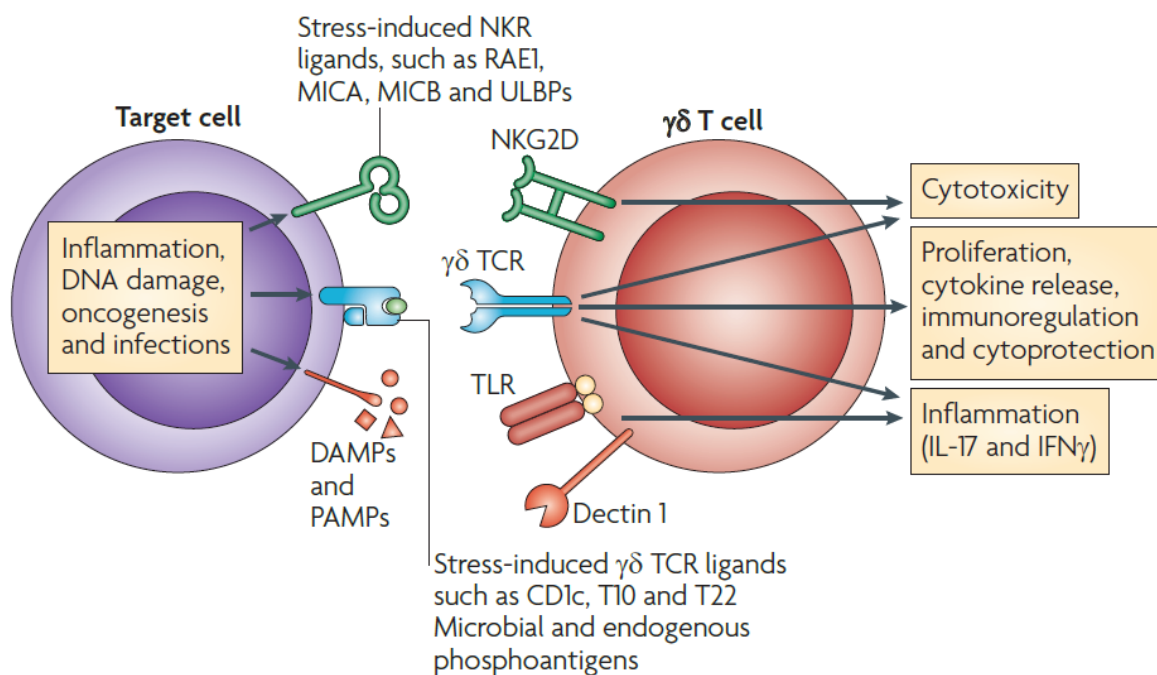


Figure 3 : Reconnaissance d'une cellule cible par les T $\gamma\delta$: Les T $\gamma\delta$ reconnaissent différents stimuli « de stress » : des molécules du CMH ou apparentées (CD1c, T10, T22) ou des P-Ags par le TCR, des ligands (RAE1, MICA, MICB, ULBPs) par des NKR tels que le NKG2D, ou bien des DAMPs et PAMPs par des TLR ou récepteur Dectin 1. En réponse à ces stimuli, les T $\gamma\delta$ sont capables d'exercer une activité cytotoxique, de proliférer et de relarguer des cytokines (Bonneville et al., 2010).

E. Fonctions effectrices des T $\gamma\delta$

De façon générale, de par leur rapide réactivité et leur localisation stratégique, les T $\gamma\delta$ jouent un rôle important dans la protection contre certains pathogènes d'origine bactérienne, virale et parasitaire ainsi que contre certains cancers. Leurs diversités phénotypiques, leurs spécificités antigéniques et leurs localisations sont associés à des fonctions effectrices diverses pour les différentes populations.

1. Activité cytotoxique

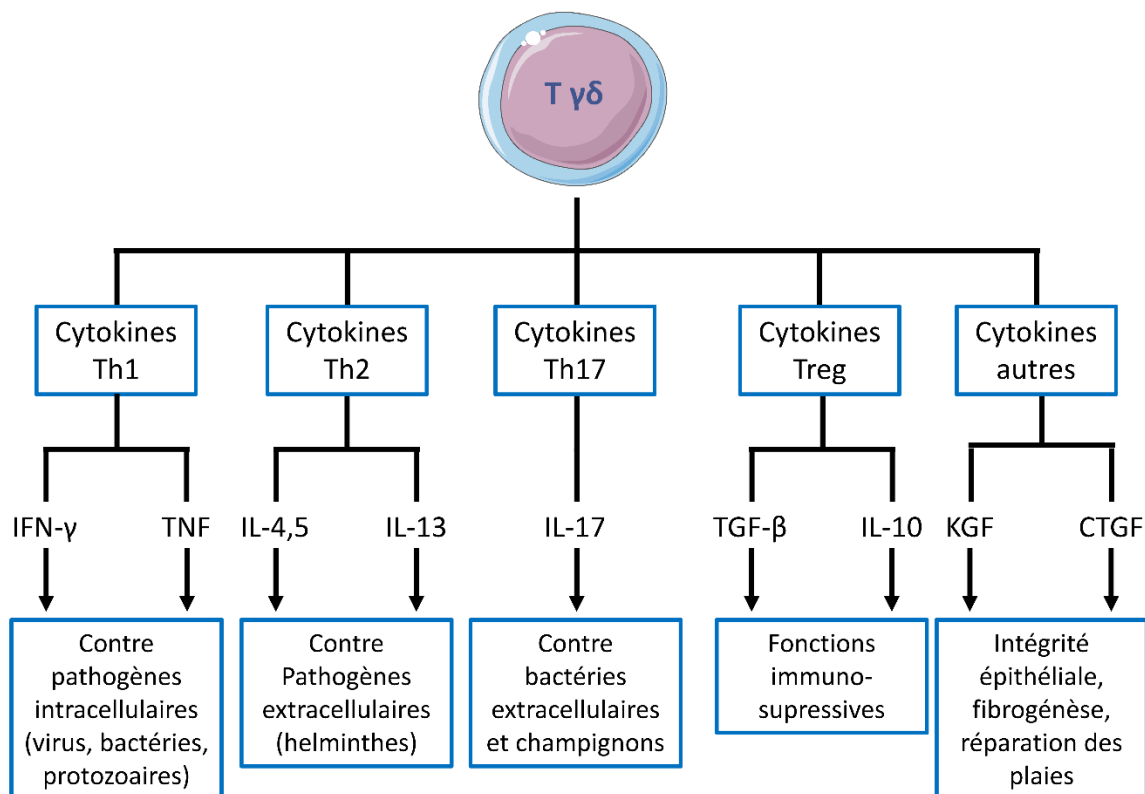
De multiples populations de T $\gamma\delta$ sont capables d'éliminer divers cellules cibles : des cellules infectées par des bactéries ou virus, et des cellules tumorales. En effet, ces lymphocytes sont capables de lyser directement ces cellules cibles ou bien d'induire leur apoptose. Plusieurs mécanismes inducteurs d'apoptose sont décrits. Les T $\gamma\delta$ peuvent induire l'apoptose des cellules cibles suite à l'engagement des récepteurs de mort CD95 (Système Fas /FasL) ou TRAILR (système TRAIL/TRAILR) (Li et al., 1998). Ces cellules peuvent aussi libérer des granules lytiques contenant le couple perforine/granzyme qui peut entraîner une lyse directe via la perforation de membrane plasmique par la perforine et l'apoptose via le clivage des caspases par les granzymes (Qin et al., 2009). Comme pour les cellules NK, ces granules lytiques sont préformés permettant une rapide cytotoxicité. Ainsi, une fois le contact cellulaire établi entre le T $\gamma\delta$ et la cellule cible, les granules sont orientés directement vers cette dernière ce qui entraîne sa mort. De plus, les T $\gamma\delta$ peuvent relarguer des granules contenant des molécules aux propriétés antimicrobiennes telles que la granulysine ou les défensines (Dieli et al., 2001).

2. Sécrétion de cytokines

En plus de leurs propriétés cytotoxiques, les T $\gamma\delta$ peuvent produire des cytokines immuno-modulatrices jouant un rôle dans la protection immunitaire contre différents types d'agents pathogènes ou dans l'inhibition de la réplication d'agents infectieux. Ayant une implication préférentielle dans la protection de pathogènes intracellulaires, les T $\gamma\delta$ produisent majoritairement des cytokines de type Th1 (IFN- γ et TNF). Cependant, face à d'autres pathogènes, ces cellules sont également capables de sécréter : de l'IL-17 en présence de champignons ou de bactéries extracellulaires (profil Th17), ou bien de l'IL-4, IL-5 et IL-13 lors d'infection parasitaire (profil Th2). Les T $\gamma\delta$ peuvent aussi avoir un profil intermédiaire en sécrétant des cytokines issues de différentes polarisations (Wu et al., 2014) (**Figure 4**). Ces cytokines produites peuvent avoir un effet bénéfique en permettant l'élimination de ces

différents agents pathogènes mais aussi un effet délétère notamment lors de maladies auto-immunes (à travers la production d'IFN- γ et d'IL-17) ou dans le cas d'allergie et d'asthme (par la sécrétion d'IL-4 et IL-13). A l'inverse, les T $\gamma\delta$ peuvent diminuer la réponse des cellules effectrices de l'immunité innée et adaptative à travers la production de cytokines immuno-régulatrices (IL-10, TGF β). Ces cellules peuvent aussi moduler les fonctions de cellules stromales, comme par exemple les DETC, qui sont capables de produire des facteurs de croissance pour les cellules épithéliales (Sharp et al., 2005).

En plus des interleukines, les T $\gamma\delta$ sécrètent des chimiokines permettant le recrutement de cellules de l'immunité. Par exemple, certains T V γ 9V δ 2 sécrètent du CXCL13 ce qui régule l'organisation des cellules B dans les follicules et les tissus lymphoïdes (Vermijlen et al., 2007). Certains sécrètent d'autres chimiokines tels que CCL4 et CXCL10 favorisant le recrutement des macrophages et des cellules NK en particulier (Vantourout and Hayday, 2013).



Figures 4 : Les différents profils cytokiniques des T $\gamma\delta$

KGF: keratinocyte growth factor. CTGF: Connective tissue growth factor.

II. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2

Chez l'Homme, la population T V γ 9V δ 2 (appelée aussi V γ 2V δ 2 ou γ 2 δ 2 par d'autres groupes) constitue la population de T $\gamma\delta$ (65 à 90%) majoritairement présente dans le sang périphérique. Elle représente entre 1 et 10% des lymphocytes T totaux circulants et peut atteindre 50% après une infection microbienne. C'est l'une des expansions clonales les plus importantes, ce qui suggère un rôle fondamental de ces cellules lors d'infection. Ces cellules ont particulièrement été décrites pour leur rôle dans l'immunité anti-infectieuse mais aussi anti-tumorale. Différents lymphocytes T V γ 9V δ 2 peuvent avoir des caractéristiques aussi bien Th1, Th2, Th17, T CD4 folliculaires, T régulateurs que de T cytotoxiques, ou des propriétés de cellules NK et de cellules présentatrices d'antigènes. Cette population est exclusivement présente chez les primates supérieurs et c'est la population qui a été la plus étudiée à ce jour chez l'Homme.

A. Composés activant les lymphocytes T V γ 9V δ 2

1. Rôle majeur des Phosphoantigènes

a) Nature des Phosphoantigènes

Rapidement après leur découverte, il a été montré que les T V γ 9V δ 2 sont réactifs au cours d'infections par les mycobactéries et face à des cellules tumorales (Fisch et al., 1990). De façon surprenante, dans le cas des mycobactéries, cette activation n'est pas due à la reconnaissance de peptides antigéniques classiquement décrits pour les lymphocytes T car l'extrait microbien est résistant à la protéinase K et sensible à la dégradation par la phosphatase alcaline. Les premières analyses sur ces composés stimulants issus de *Mycobacterium tuberculosis* ont mené à l'identification de 4 fractions en chromatographie liquide, appelés TUBag 1-4 (Tuberculosis Antigènes 1-4) correspondant à des alkyles pyrophosphorylés et des dérivés nucléotidiques triphosphates de ces mêmes alkyles. En parallèle, une autre équipe a identifié d'autres antigènes phosphorylés naturels qui sont l'isopentenyl-pyrophosphate (IPP) et le dyméthylallyl pyrophosphate (DMAPP) (Tanaka et al., 1995; Tanaka et al., 1994). Il a ensuite été mis en évidence l'hydroxy-diméthylallyl pyrophosphate (HDMAPP) également appelé (E)-4-hydroxy-3-méthyl-but-2-enyl pyrophosphate (HMBPP) par une autre équipe qui finalement correspond à celui initialement mis en évidence chez les mycobactéries : TUBag 1.

Ces différents composés sont produits par de multiples micro-organismes et plantes (Behr et al., 1996; Fischer et al., 1996). L'IPP et le DMAPP sont quant à eux, également produits par les cellules eucaryotes.

Dans des cellules eucaryotes, plusieurs équipes ont pu montrer qu'un dérivé nucléotidique (adénylé) de l'IPP existe de façon naturelle : l'Apppl. Celui-ci pourrait être produit à partir d'IPP et d'adénosine monophosphate par une aminoacyl tRNA synthase (Monkkonen et al., 2006; Monkkonen et al., 2007). Il a été démontré que ce dérivé Apppl confère aux cellules tumorales les caractéristiques de cellules naturellement activatrices des T Vγ9Vδ2 et que cette stimulation nécessite un processus d'hydrolyse en IPP pour être actif (Vantourout et al., 2009). Ces dérivés nucléotidiques ont la capacité de se lier à certaines protéines cellulaires et pourraient jouer un rôle particulier dans les mécanismes d'action de ces composés phosphorylés (Mookerjee-Basu et al., 2010).

L'ensemble de ces composés non-peptidiques, de faibles poids moléculaires sont appelés « phosphoantigènes » (P-Ags) (Behr et al., 1996; Belmant et al., 1999; Constant et al., 1994). Leur structure globale est dérivée de celle des isoprénoïdes, comportant une courte chaîne hydrocarbonée (le plus souvent à 5 carbones) et un groupement pyrophosphate (**Figure 5**).

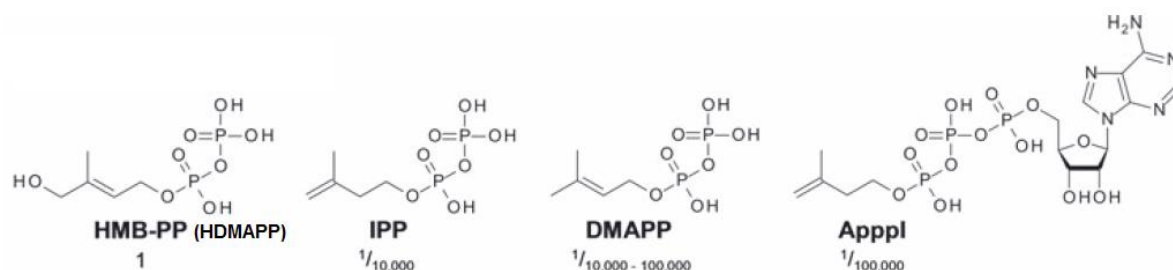


Figure 5 : Structures des Phosphoantigènes naturels avec leur activité sur les T Vγ9Vδ2 indiquée en dessous comparée à celle de l'HDMAPP (activité de l'HDMAPP représentant le 1) (Riganti et al., 2012).

b) Origine des Phosphoantigènes

Ces différents composés phosphorylés sont des métabolites de la voie de biosynthèse des isoprénoïdes et stérols, cette dernière étant une voie essentielle au métabolisme cellulaire des différents organismes.

La plupart des eubactéries, archées, plantes et certains parasites protozoaires produisent ces métabolites phosphorylés par la voie 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate (DOXP) / méthylérythritol phosphate (MEP), voie alternative de la synthèse du cholestérol. La voie du DOXP démarre par un pyruvate et du D-Glyceraldehyde-3-phosphate qui après plusieurs étapes aboutit à la synthèse de HDMAPP suivi de DMAPP et d'IPP (**Figure 6**) (Kollas et al., 2002).

Il existe une voie de biosynthèse des isoprénoïdes et des stérols chez les eucaryotes (plantes et animaux) et les archaeobactéries, équivalente à la voie du DOXP : la voie du mévalonate (MVA). Cette voie représente la seule voie de biosynthèse de stérols et de dérivés prénylés qui sont importants dans de nombreuses fonctions cellulaires. Elle aboutit à la synthèse d'IPP et DMAPP (**Figure 6**). L'HDMAPP étant issu de la voie du DOXP exclusivement, il n'est pas produit par des cellules eucaryotes humaines.

La voie métabolique DOXP/MEP, présente uniquement chez certains microorganismes, conduit à la production du métabolite HDMAPP qui a des effets stimulants sur les T Vγ9Vδ2 nettement supérieurs à ceux obtenus avec les métabolites IPP/DMAPP. Ainsi, le HDMAPP est un P-Ag dit « fort » car il est 1000 fois plus efficace que l'IPP et le DMAPP qui sont des P-Ags dits « faible ».

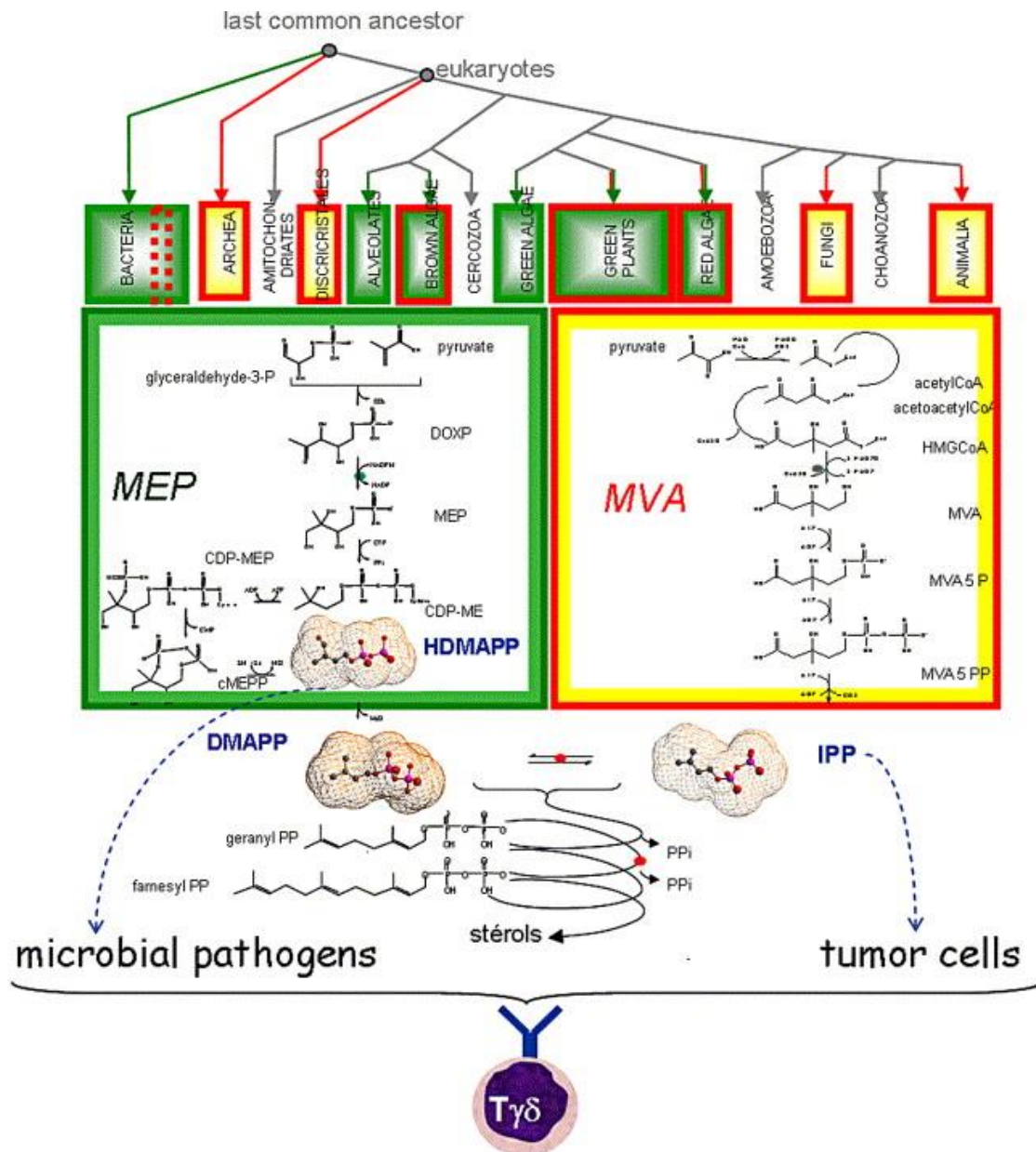


Figure 6 : Les voies de biosynthèse du cholestérol DOXP/MEP et MVA induisent une production de P-Ags. En haut de la figure : Distribution phylogénétique simplifiée des voies du DOXP/MEP (vert) et du MVA (jaune). En bas de la figure : production des P-Ags HDMAPP, DMAPP et IPP par les voies de biosynthèse DOXP et MVA. Ces P-Ags sont ensuite reconnus par le T $\gamma\delta$ (V γ 9V δ 2) via leur TCR (Bonneville and Fournie, 2005)

2. Phosphoantigènes synthétiques

De nombreux agonistes des P-Ags naturels pour les lymphocytes T $\gamma\delta$ ont été produits par synthèse chimique tels qu'un analogue de l'HDMAPP (cHDMAPP/ HMB-CPP /PicostimTM), le BrHPP (PhosphostimTM), et le 2-méthyl-3-butenyl pyrophosphate (2M3BPP). Ces trois analogues synthétiques sont actuellement en cours d'essai clinique pour le développement d'immunothérapie ciblant les T V γ 9V δ 2 (Riganti et al., 2012) (**Figure 7**).

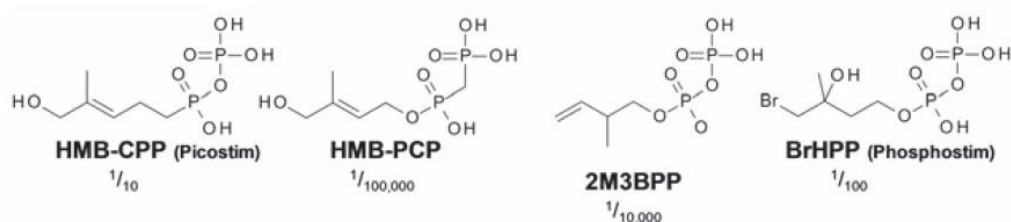


Figure 7 : Structures des Phosphoantigènes synthétiques avec leur activité sur les T Vγ9Vδ2 indiquée en dessous comparée à celle de l'HDMAPP (activité de l'HDMAPP représentant le 1) (Riganti et al., 2012)

3. Les Aminobisphosphonates:

En plus des P-Ags, d'autres composés pharmacologiques sont décrits comme étant stimulateurs des T Vγ9Vδ2 : les aminobisphosphonates (ABP) et les alkylamines. Les alkylamines étant moins étudiés que les ABP, principalement en raison de leurs propriétés stimulatrices moins fortes, nous nous focaliserons principalement sur les ABP.

Les Bisphosphonates (famille contenant entre autre les ABP) ont été synthétisés pour la première fois au milieu du XIX^{ème} siècle et ont été utilisés principalement en tant qu'agents détartrants dans l'industrie. Ce n'est que durant ces cinquante dernières années que ceux-ci furent utilisés pour traiter des pathologies ainsi qu'étudiés pour leur propriétés stimulantes sur les T Vγ9Vδ2.

a) Utilisation thérapeutique des bisphosphonates

Les bisphosphonates (BP) sont actuellement utilisés depuis de nombreuses années pour traiter des maladies liées à une résorption osseuse telles que l'ostéoporose, la maladie de Paget (*Osteitis deformans*), et des maladies cancéreuses métastatiques associées à une ostéolyse importante. Ceux-ci limitent l'ostéolyse excessive en inhibant principalement l'activité des ostéoclastes.

Les BP ont une structure chimique similaire à celle des pyrophosphates inorganiques qui sont des régulateurs endogènes de la minéralisation osseuse (Rogers et al., 2000). Après la prise de ce traitement, la molécule se retrouve localisée sur les sites présentant une forte activité des ostéoclastes, tel que cela a été démontré par l'utilisation d'Alendronate-H³ qui, après injection en intraveineuse dans des rats, a été détecté principalement sur les sites de résorption osseuse (Sato et al., 1991). Ils sont constitués d'une structure de base Phosphate-Carbone-Phosphate (P-C-P) sur laquelle sont rattachées au niveau du carbone deux chaînes

latérales (R1 et R2) (**Figure 8**). Leur structure tridimensionnelle, le squelette P-C-P et la nature de la chaîne latérale R1 (généralement un hydroxyle) permet à la molécule de pouvoir fixer et chélater le calcium, ce qui leur confère une forte affinité pour le minéral osseux. La chaîne latérale R2, quant à elle, est à l'origine de l'activité inhibitrice sur les ostéoclastes. Suivant la nature de cette chaîne R2, deux types de BP sont obtenus ayant des activités différentes : les aminobisphosphonates (ABP) et les non-aminobisphosphonates (NABP).

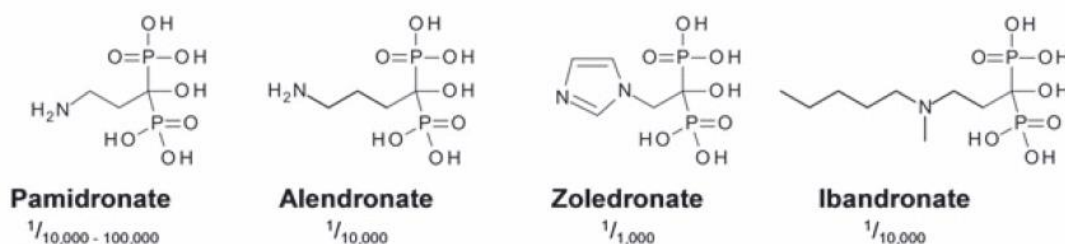


Figure 8 : Structures des aminobisphosphonates avec leur activité sur les T Vγ9Vδ2 indiquée en dessous comparée à celle de l'HDMAPP (activité de l'HDMAPP représentant le 1). (Riganti et al., 2012).

Les NABP, qui n'ont pas de groupement amine dans la chaîne latérale R2, entrent directement dans les ostéoclastes par endocytose. Ceux-ci sont capables de former des analogues non hydrolysables de l'ATP qui, une fois accumulés dans les ostéoclastes, entraînent leur apoptose (Frith et al., 1997). Ainsi de nombreuses études ont démontré que les NABP induisent la mort par apoptose des ostéoclastes de souris, rat ou lapin *in vitro* et *in vivo* (Hughes et al., 1995). Ce phénomène serait le mode d'action principal des BP pour limiter l'ostéolyse. De plus, les NABP sont capables d'inhiber les ATPases, pompes à protons présentes dans les vacuoles des ostéoclastes qui sont requises pour leur activité (David et al., 1996), ainsi que d'inhiber certaines protéines tyrosines phosphatases connues pour être impliquées dans l'activité ostéolytique (Schmidt et al., 1996). Les BP classiquement utilisés sont le clodronate, le tiludronate et l'etidronate.

Les ABP ont un groupement amine dans leur chaîne latérale R2 (**Figure 8**). Contrairement aux NABP, ceux-ci n'induisent pas de métabolites toxiques pour les ostéoclastes par leur chaîne R2 mais la présence de ce groupement amine augmente malgré tout leur activité qui est ainsi de 1000 à 10000 fois supérieure à celle des BP tel que l'etidronate *in vivo*. La présence de ce groupement amine leur confère un mode d'action différent de celui observé avec les BP. En effet, ces molécules sont capables d'interférer avec la voie du MVA, voie présente dans toutes les cellules eucaryotes, qui aboutit à la production de cholestérol,

stérols et d'isoprénoïdes. Les ABP bloquent une enzyme clé de cette voie : la Farnésyl Pyrophosphate Synthase (FPPS) (**Figure 9**). Ceci a pour conséquence une inhibition de la prénylation (farnesylation et geranylgeranylprénylation) des GTPases (Rho, Rac, Ras). Ces GTPases jouent un rôle important dans la régulation des fonctions des ostéoclastes en contrôlant le réarrangement du cytosquelette, le trafic vésiculaire et l'apoptose (Rogers et al., 2000).

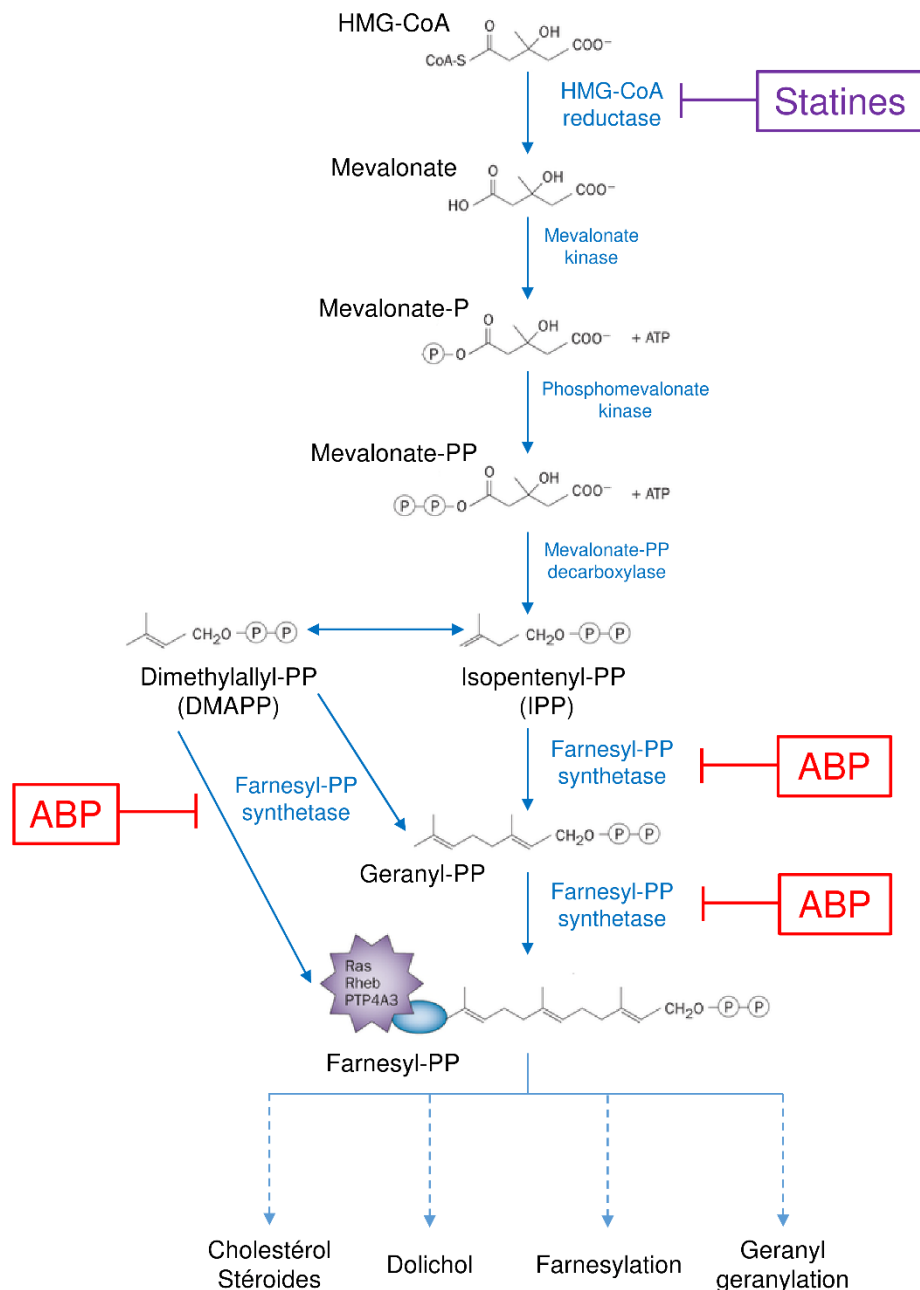


Figure 9 : Voie du mévalonate : La voie du mévalonate aboutit à la synthèse de cholestérol, stéroïdes, dolichol et des protéines farnésylées et geranylgeranylées. Les ABP bloquent l'enzyme farnésyl pyrophosphate synthase ce qui entraîne l'accumulation de l'IPP. Les statines bloquent l'enzyme HMG-CoA reductase, ce qui inhibe la production d'IPP.

b) Utilisation des ABP dans certaines pathologies cancéreuses

Les métastases osseuses sont une cause majeure de décès chez les patients atteints de cancer, en particulier du sein et de la prostate. Des données cliniques et expérimentales démontrent que le traitement par des ABP permet une diminution de la progression des métastases osseuses et que celle-ci serait indépendante d'un effet des ABP sur l'inhibition de la résorption osseuse (Cleazardin, 2011). Autrement dit, les ABP n'agissent pas uniquement sur les ostéoclastes mais également directement sur des cellules tumorales (Caraglia et al., 2006).

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la dissémination des cellules métastatiques dans le tissu osseux. Il a été démontré un rôle du traitement par les ABP sur certains de ces mécanismes par son action sur la voie du MVA. En effet, les ABP peuvent induire une inhibition de l'adhésion et de la migration des cellules cancéreuses sur la matrice osseuse (Boissier et al., 1997). De plus, il a été observé un effet anti-prolifératif de ceux-ci, avec une perturbation importante du cycle cellulaire dans les cellules cancéreuses traitées menant jusqu'à la mort cellulaire par apoptose avec des doses importantes d'ABP (zolédrone 40-100µM) (Kuroda et al., 2004). Des effets variables sont cependant observés en fonction du type cellulaire des cellules cancéreuses (Caraglia et al., 2006). A des doses plus faibles, les ABP ont aussi un effet anti-invasif sur les cellules de carcinomes de sein ou de la prostate (Boissier et al., 2000). Enfin, ceux-ci ont été décrits comme pouvant diminuer l'angiogenèse qui est un mécanisme majeur de la croissance tumorale et la dissémination métastatique (Fournier et al., 2002; Stresing et al., 2011).

L'ensemble de ces données confirme un effet anti-tumoral des ABP, qui varie selon le type cellulaire. A l'heure actuelle, les mécanismes moléculaires mis en jeu restent encore à déterminer.

c) Traitement ABP: mode d'activation des T Vγ9Vδ2

En 1999, il a été observé, chez des patients traités par un ABP, le pamidronate, une réaction inflammatoire aigüe accompagnée d'une amplification importante des T Vγ9Vδ2 (Kunzmann et al., 1999). Ce composé pharmacologique a été ensuite décrit comme pouvant activer les T Vγ9Vδ2 *in vitro* (Kunzmann et al., 2000).

Le mécanisme d'action des ABP sur les T Vγ9Vδ2 a pu être compris lorsqu'il a été mis en évidence que ce composé était capable d'inhiber la voie MVA. En bloquant l'enzyme FPPS, qui transforme l'IPP en Geranyl-Pyrophosphate et Farnesyl-pyrophosphate, les ABP induisent une accumulation du métabolite en amont qui est l'IPP, responsable de l'activation des T Vγ9Vδ2 (**Figure 9**) (Gober et al., 2003). De plus, l'effet stimulant induit par le blocage de la voie du MVA a été confirmé par l'utilisation de statines qui sont capables d'inhiber une enzyme dans la voie du MVA, l'HMG-CoA reductase qui transforme l'HMG-CoA en mévalonate. Son

blocage entraîne une diminution de la formation d'IPP en aval, ce qui abolit l'effet stimulant des ABP sur les T V γ 9V δ 2 (**Figure 9**).

Par conséquent, les ABP ne sont pas à proprement parler des P-Ags, mais ils induisent la production de ceux-ci.

4. Les Alkylamines

Les alkylamines sont des composés naturels, identifiés à partir de la bactérie *Proteus morganii*. Ils sont sécrétés par certaines bactéries commensales ou pathogènes et sont également présents dans des produits végétaux comestibles comme le thé, le vin, les pommes et les champignons.

Ces composés naturels sont capables d'activer les T V γ 9V δ 2 et semblent agir comme les ABP par une inhibition de la FFPS dans la voie du MVA. En effet, un traitement par des statines abolit l'effet stimulant des alkylamines sur les T V γ 9V δ 2 (Thompson et al., 2006) .

Par conséquent, tout comme les ABP, les alkylamines ne sont pas à proprement parler des P-Ags, mais ils induisent la production de ceux-ci. Cependant, cet effet requiert de fortes concentrations comparé à ce qui est obtenu avec les ABP, ce qui en fait de moins bons stimulateurs des T V γ 9V δ 2.

B. Mécanismes d'action des Phosphoantigènes

Alors que les mécanismes de reconnaissance de peptides antigéniques par les T $\alpha\beta$ conventionnels sont connus depuis de nombreuses années, ceux concernant les T V γ 9V δ 2 restent mal définis.

Les T V γ 9V δ 2 peuvent être activés en présence de cellules cibles et de lysat microbien contenant les P-Ags décrits précédemment (Lang et al., 1995). Cette activation est dépendante d'une stimulation de leur TCR V γ 9V δ 2 car la transfection du TCR γ 9 δ 2 dans des cellules Jurkat déficientes pour l'expression du TCR $\alpha\beta$, rend ces cellules réactives aux P-Ags (Bukowski et al., 1995). Cette reconnaissance ne nécessite pas de cellules présentatrices spécialisées mais nécessite un contact du T V γ 9V δ 2 avec une autre cellule qui doit être une cellule humaine (pouvant être une autre cellule T V γ 9V δ 2) (Morita et al., 1995). Par ailleurs, bien que la structure tridimensionnelle du TCR suggère que celui-ci possède un site de liaison antigénique compatible avec la structure générale des P-Ags, aucune étude n'a réussi à mettre en évidence cette interaction entre les P-Ags et le TCR des T V γ 9V δ 2 (Allison et al., 2001).

En ce qui concerne l'utilisation des ABP et les alkylamines, c'est l'accumulation intracellulaire de P-Ags des cellules traitées qui les rend stimulantes. Comme pour la stimulation par les P-Ags, l'activation des T V γ 9V δ 2 par ces composés dépend d'une activation de leur TCR V γ 9V δ 2 (Bukowski et al., 1999; Das et al., 2001b). La stimulation des T V γ 9V δ 2 obtenue par les ABP est différente de celle observée par traitement direct avec les P-Ags : l'activation des T V γ 9V δ 2 est plus lente à se mettre en place. Ceci serait certainement dû au temps nécessaire pour que le blocage de la FPPS soit suffisant pour induire une concentration de P-Ags détectable par les lymphocytes. De plus, la stimulation par ceux-ci nécessite des cellules présentatrices d'antigènes (pas nécessairement professionnelles) (Miyagawa et al., 2001). Nous verrons dans la partie D le rôle du traitement ABP sur l'activité anti-tumorale et anti-infectieuse des T V γ 9V δ 2. Dans tous les cas, c'est la production de P-Ags qui est déterminante pour l'activation du TCR V γ 9V δ 2.

De nombreuses molécules de présentation connues ont été testées pour déterminer si elles pouvaient être impliquées dans la présentation des P-Ags. Aucune des molécules de CMH-I, CMH-II et CD1 n'est nécessaire à l'activation des T V γ 9V δ 2. Il a donc été émis comme hypothèse que les P-Ags avaient un effet indirect sur l'activation des T V γ 9V δ 2 : Les P-Ags ne seraient pas présentés directement au TCR des T V γ 9V δ 2 mais ils seraient capables de modifier des protéines membranaires favorisant leur reconnaissance par les T V γ 9V δ 2. Suivant cette hypothèse, les protéines de choc thermique (HSP) ont été proposées comme étant impliquées dans cette activation suite à l'observation d'une reconnaissance de cellules tumorales par les T V γ 9V δ 2 (humains et murins) corrélé avec une augmentation de l'expression de HSP (en particulier Hsp60) (O'Brien et al., 1991). Cependant, une interaction directe des HSP avec les T V γ 9V δ 2 n'a jamais été mise en évidence.

Il y a quelques années, un complexe membranaire, l'ecto-F1-ATPase, a été proposé pour la présentation des P-Ags.

1. L'ecto-F1-ATPase

L'ecto-F1-ATPase est un complexe analogue à l'ATP synthase mitochondriale, exprimé de façon ectopique à la membrane cellulaire de différentes lignées cellulaires tumorales (Scotet et al., 2005). Celui-ci semble avoir un rôle dans l'activation des T V γ 9V δ 2. En effet, une interaction entre l'ecto-F1-ATPase purifié et des TCR recombinants purifiés de T V γ 9V δ 2 a été observée. Il semblerait que cette interaction soit favorisée en présence d'une forme délipidée de l'apolipoprotéine A1 (Apo A1) qui pourrait stabiliser le contact entre les deux molécules (Scotet et al., 2005). Cette interaction entre l'ecto-F1-ATPase/ApoA1 et le

TCR induit une activation des T V γ 9V δ 2 qui se traduit par une sécrétion de TNF. Cette étude combinée à l'étude décrite précédemment (partie II. A. 1. a) sur le rôle de l'Apppl (Vantourout et al., 2009) ont amené à proposer un modèle pour la reconnaissance des P-Ags qui fait intervenir la liaison du TCR avec un complexe formé à la membrane par la liaison d'un P-Ag nucléotidique (Apppl) avec l'ecto-F1-ATPase (Mookerjee-Basu et al., 2010) (**Figure 10**).

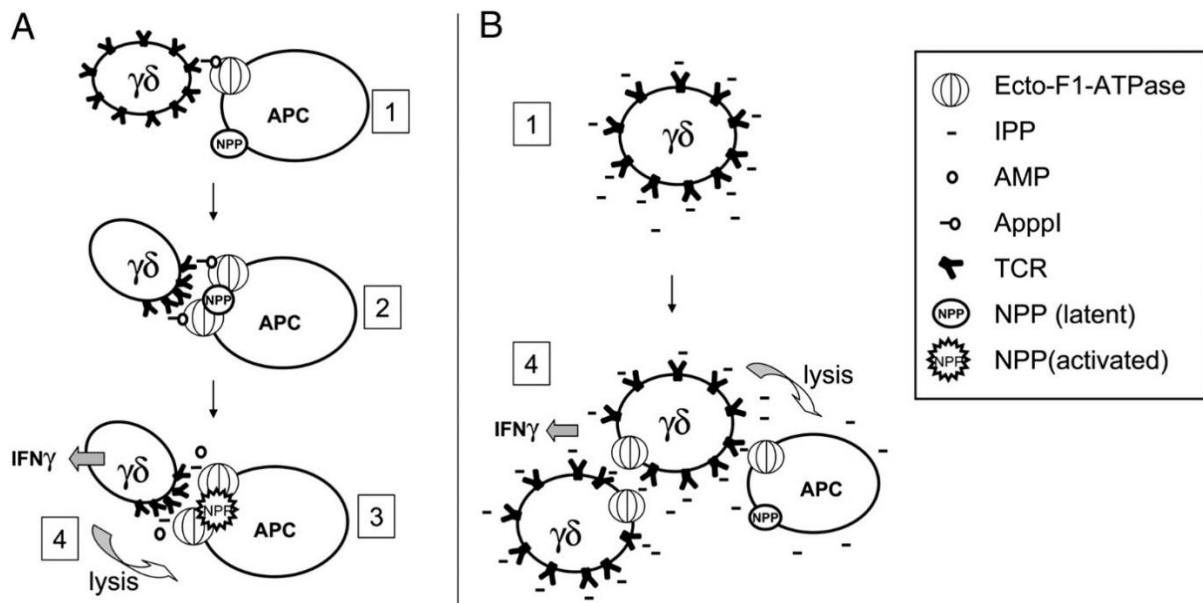


Figure 10 : Modèle hypothétique d'activation des T V γ 9V δ 2 : (A) Les P-Ags sont détectés par les T V γ 9V δ 2 sous forme de dérivés nucléotidiques (telle que l'Apppl) présenté par l'ecto-F1-ATPase. Après reconnaissance de l'Antigène (étape 1) et l'aggrégation du TCR (étape 2), il pourrait y avoir un recrutement ou l'activation d'une éventuelle nucléotide pyrophosphatase (NPP) à la surface de la cellule APC (cellule cible), ce qui entraîne l'hydrolyse du P-Ag (étape 3). Cette hydrolyse est requise pour une activation complète des fonctions effectrices des T V γ 9V δ 2 (étape 4). (B) En solution les P-Ags ne sont pas reconnus car il n'y a pas d'interaction avec l'ecto-F1-ATPase présente sur les cellules voisines (étape 1). Cependant si le P-Ag est présent en grande quantité, celui-ci pourrait rentrer en contact avec le TCR, et l'ecto-F1-ATPase présents sur les cellules. D'autres corécepteurs seraient mis en jeu ce qui assurerait l'activation des T V γ 9V δ 2 (étape 4) (Mookerjee-Basu et al., 2010).

Cependant, ces dernières années ont été marquées par la découverte de l'implication d'une nouvelle molécule dans l'activation des T V γ 9V δ 2 : la Butyrophiline 3A.

2. La Butyrophiline

La molécule BTN3 appartient la superfamille des Butyrophilines qui sont notamment décrites pour leurs différents rôles dans la régulation des réponses immunitaires (Arnett and Viney, 2014). Chez l'Homme, il existe 3 isoformes de la BTN3 : BTNA3A1, BTN3A2 et BTN3A3. La BTN3 (CD227) est une protéine membranaire qui a une homologie structurale avec la superfamille des protéines de co-stimulation B7. Elle a un domaine extracellulaire

(DEC) possédant une partie N-terminale ayant une structure semblable au domaine V des Immunoglobulines et une partie proximale ayant des similitudes avec le domaine C des immunoglobulines. Ce domaine DEC est conservé entre les 3 isoformes ce qui rend l'identification de l'isoforme impossible par cette partie de la BTN. Le domaine intracellulaire (DIC) de BTN3A1 et de la BTN3A3 possède un domaine B30.2, connu pour pouvoir interagir avec des protéines intracellulaires dans d'autres complexes (**Figure 11**).

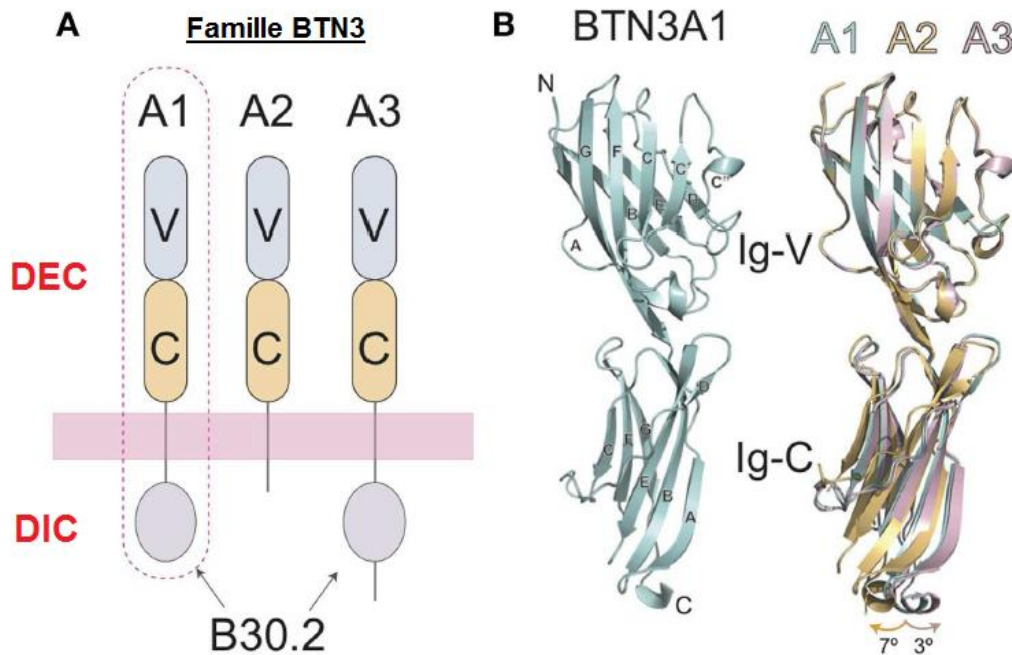


Figure 11 : Structure de la BTN3 : (A) La BTN3 est une protéine membranaire qui existe sous 3 isoformes : A1, A2, A3. Chaque isoforme possède une partie extracellulaire (DEC) avec un domaine variable (V) et un domaine constant (C), et une partie intracellulaire (DIC). Les BTN3 A1 et A3 possèdent une région B30.2. (B) Structure tridimensionnelle de la partie DEC de la BTN3A1 à gauche (en bleu) et superposée à celle de la BTN3 A2 et A3 à droite (en jaune et rose respectivement). Les structures sont fortement homologues avec seulement quelques variations sur les régions charnières entre les domaines V et C. Modifiée de (Gu et al., 2014).

Il a été montré un rôle d'une protéine apparentée à la BTN dans l'activation d'une population de T $\gamma\delta$ chez la souris : Skint1. En effet, Skint1 est associé à la sélection et l'activation des T V γ 5V δ 1 dans la peau des souris (Boyden et al., 2008).

La première démonstration de l'implication de la BTN3 dans l'activation des T V γ 9V δ 2 a été faite par l'équipe d'Emmanuel Scotet et de Marc Bonneville. Ils ont observé une activation de ces cellules (sécrétion de cytokines et cytotoxicité) et une augmentation de l'expression de CD69 en présence d'Ig monoclonales agonistes de la BTN3A1 (mAb 20.1) (Harly et al., 2012).

Le traitement de cellules tumorales avec ces agonistes les rendent stimulantes (comme un traitement par des P-Ags ou des ABP) et implique une stimulation du TCR des T V γ 9V δ 2. De plus, l'activation induite par des P-Ags ou des ABP est inhibée en présence d'Ig antagonistes de la BTN3A1 (mAb 103.2).

Plus précisément, seule l'isoforme BTN3A1, et non BTN3A2 et A3 est mise en jeu dans l'activation du TCR de ces cellules (Wang et al., 2013). L'importance de cette molécule a été confirmée par la mise en évidence que les Ig agonistes de la BTN3A1 induisent une stimulation de leur TCR aussi importante que celle observée en présence de P-Ags (Decaup et al., 2014). De plus, cette stimulation par mAb 20.1 (Ig agonistes) est résistante aux statines et n'est pas accompagnée d'une accumulation d'IPP comme lors d'un traitement par des ABP, ce qui permet d'affirmer que la BTN3A1 ne joue pas un rôle dans la voie du MVA (Wang et al., 2013).

Suite à ces récentes découvertes du rôle crucial de la BTN3A1 dans l'activation des T V γ 9V δ 2, deux hypothèses ont été émises quant au mode d'action des P-Ags (Karunakaran and Herrmann, 2014). En effet, deux études montrent un rôle de la BTN3A1, une par l'utilisation d'Ig monoclonales, l'autre génétique. Néanmoins elles proposent des rôles différents de cette protéine.

a) Modèle allostérique

La première hypothèse est que les P-Ags intracellulaires lient le domaine DIC de la BTN3A1, ce qui induit un changement dans la partie DEC soit directement soit par l'intermédiaire d'autres molécules inconnues. Ces événements sont accompagnés d'une réduction de la mobilité des BTN3A1 qui vont s'associer entre elles ou avec d'autres molécules non identifiées afin de pouvoir se lier au TCR V γ 9V δ 2 (**Figure 12**).

A la vue des premiers résultats obtenus en 2012 (Harly et al., 2012), le blocage seul de la BTN par des Ig antagonistes, suffit à inhiber l'activation des T V γ 9V δ 2. Par conséquent la BTN3A1 suite à un changement de conformation pourrait être le ligand du TCR. De plus, l'augmentation intracellulaire de P-Ags induit par un traitement ABP, est corrélée à une diminution de la mobilité des molécules de BTN3A1 à la membrane. Ainsi, une étude a été menée sur la caractérisation structurelle et fonctionnelle de la partie DEC de BTN3A1 et le rôle des Ig agonistes et antagonistes de celle-ci (Palakodeti et al., 2012). La partie DEC apparaît sous forme de dimères symétriques ou asymétriques. Les Ig agonistes (mAb 20.1) mais pas les Ig antagonistes (mAb 103.2), induiraient un changement de conformation en faveur de la formation de dimères symétriques. En ce qui concerne le domaine DIC de la BTN3A1, d'après l'étude de Harly et ses collaborateurs, la région B30.2 serait nécessaire à l'activation des T

V γ 9V δ 2. Ces résultats ont été approfondis par une autre équipe qui a mis en évidence récemment, par cristallographie, que cette région B30.2 interagit avec les P-Ags IPP et HDMAPP (Sandstrom et al., 2014). Ceci expliquerait aussi la raison pour laquelle l'isoforme BTN3A3, possédant une région B30.2 différente, n'est pas impliquée dans l'activation des T V γ 9V δ 2. Il est à noter que, d'après leur étude, la BTN3A1 est nécessaire mais non suffisante pour l'activation des T V γ 9V δ 2 : la présence de P-Ags est toujours nécessaire pour l'activation de ces cellules.

Une récente étude a mis en évidence le rôle d'une autre protéine dans ce phénomène : la périplakine. Cette protéine est décrite comme étant liée au cytosquelette cellulaire. Il a été démontré que celle-ci interagit avec la BTN3A1 en intracellulaire à proximité de la région B30.2 et serait nécessaire pour l'activation des T V γ 9V δ 2 (Rhodes et al., 2015). De plus, des molécules codées par le chromosome 6 (autre que la BTN3A1) semblent requises pour l'activation des T V γ 9V δ 2 par les P-Ags (Riano et al., 2014).

b) Modèle de présentation antigénique

L'équipe de Gennaro De Libero a émis une autre hypothèse qui est que la BTN3A1 pourrait agir comme une molécule présentatrice de P-Ags (**Figure 12**) (Vavassori et al., 2013). Ils ont utilisé un modèle différent de celui utilisé par Harly et ses collaborateurs : Génération de transfectants qui expriment le domaine V de la partie DEC de la BTN3A1. En présence de P-Ags ces transfectants sont capables de stimuler les T V γ 9V δ 2. De plus, ils montrent par cristallographie que ce domaine possède une poche dans laquelle le P-Ag peut se lier et être ainsi présenté au TCR des T V γ 9V δ 2.

Cependant, Cette dernière hypothèse semble contradictoire avec celle d'Erin Adams (modèle allostérique) proposé plus récemment car, dans ce cas-là, comment expliquer le rôle essentiel du domaine B30.2 dans la partie intracellulaire ? Il a donc été proposé un troisième modèle hypothétique qui pourrait concilier les deux modèles.

a) 3^{ème} modèle

Dans ce modèle, le P-Ag pourrait interagir avec le domaine B30.2 de la partie DIC puis serait exporté hors de la cellule par une molécule de transport non identifiée à ce jour (**Figure 12**). Le P-Ags exporté pourrait alors interagir avec le domaine V de la partie DEC et serait présenté au TCR des T V γ 9V δ 2 (Harly et al., 2014).

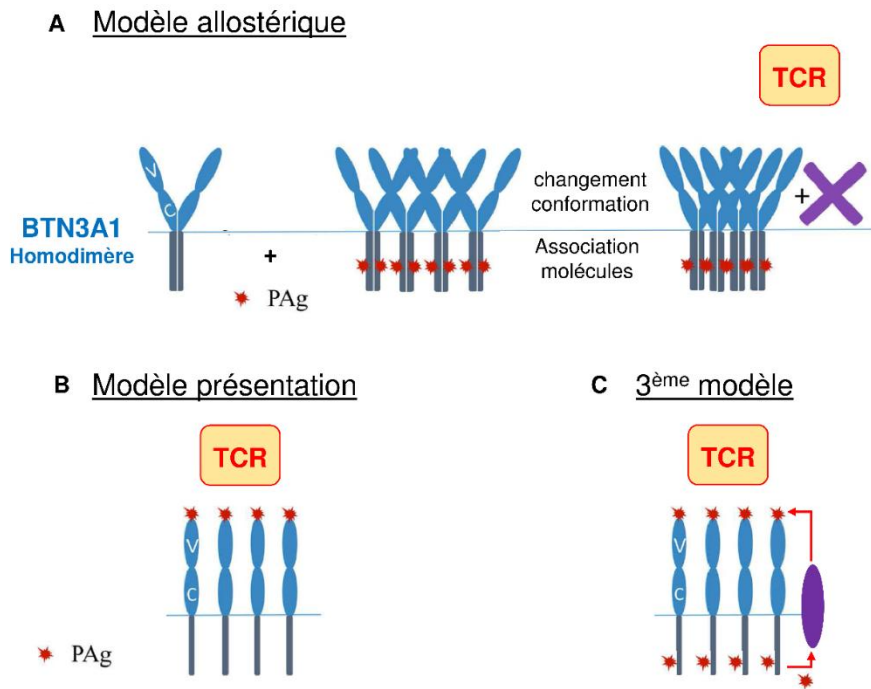


Figure 12 : Les différents modèles proposés impliquant la BTN3A1 dans l'activation des T V γ 9V δ 2 : **(A)** Modèle allostérique : Les P-Ags endogènes se fixent à la partie DIC de le BTN3A1, ce qui entraîne un changement de conformation de celle-ci qui s'associe à d'autres molécules identiques ou différentes (X) telle que la molécule periplakine. L'ensemble est ensuite reconnu par le TCR des T V γ 9V δ 2. **(B)** Modèle de présentation antigénique : Les P-Ags sont reconnus par la partie DEC de la BTN3A1 et peuvent ainsi être présentés au TCR des T V γ 9V δ 2. **(C)** 3^{ème} modèle : Les P-Ags endogènes se fixent à la partie DIC de le BTN3A1 (domaine B30.2), puis sont transportés à l'extérieur de la cellule par une molécule de transport actuellement inconnue (violet). Les P-Ags sont alors reconnus par la partie DEC de la BTN3A1 et ainsi présentés au TCR des T V γ 9V δ 2. Modifiée d'après (Karunakaran and Herrmann, 2014).

Par conséquent, la BTN3A1 a un rôle clé dans l'activation des T V γ 9V δ 2 mais on ne sait pas actuellement si elle est reconnue directement ou non par le TCR $\gamma\delta$ de ces cellules.

C. Régulation de l'activation des T V γ 9V δ 2

Etant donné que les T V γ 9V δ 2 sont activés par des antigènes du soi et du non soi via leur TCR (IPP / Apppl), un co-stimulus est nécessaire afin de discriminer des cellules saines des cellules infectées ou tumorales. Contrairement aux T $\alpha\beta$ conventionnels, les T V γ 9V δ 2 n'expriment généralement pas le corécepteur CD28 à l'origine la prolifération et de l'activation des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺. Cependant, ceux-ci expriment d'autres récepteurs, tels que des NKR, TLR, des molécules d'adhésion et des Fc récepteurs permettant une activation spécifique contre des cellules tumorales ou infectées et limitant ainsi les risques d'auto-immunité (**Figure 13**).

1. NKR

Comme l'ensemble des T $\gamma\delta$, l'activation des T V γ 9V δ 2 est régulée par la stimulation de NKR activateurs ou inhibiteurs exprimés à la membrane cellulaire.

a) NKR inhibiteurs

La majorité des T V γ 9V δ 2 expriment des NKR inhibiteurs appartenant à la famille des lectines de type C (tel que l'hétérodimère CD94/NKG2A) ou à la superfamille des Ig (immunoglobuline like transcript 2/ ILT2/LIR-1). Ces récepteurs induisent un signal inhibiteur suite à une reconnaissance des molécules de CMH-I classiques (HLA-A, B, C chez l'Homme) ou non classiques (HLA-E) selon le récepteur.

Le récepteur inhibiteur CD94/NKG2A, exprimé à la surface des nombreux clones T V γ 9V δ 2, a pour ligand la molécule de CMH non classique HLA-E. Etant donné que cette molécule présente principalement des peptides dérivés de la séquence leader des autres molécules de CMH classiques, sa reconnaissance permet aux lymphocytes de vérifier que l'expression de ces molécules classiques est normale. La stimulation du CD94/NKG2A induit une inhibition de la prolifération et des fonctions effectrices (production de cytokines et activité cytotoxique) des T V γ 9V δ 2. Cependant, ce récepteur est impliqué dans la reconnaissance de cellules infectées ou tumorales par les T V γ 9V δ 2 (Poccia et al., 1997). En effet, des cellules tumorales telles que les cellules Daudi (Lymphome de Burkitt) et K562 (érythroleucémie) sont décrites comme n'exprimant pas ou peu des molécules HLA-E (Marin et al., 2003). En présence de ces cellules, les T V γ 9V δ 2 ont une activité cytotoxique augmentée du fait d'une levée de l'inhibition par ces récepteurs inhibiteurs (Fisch et al., 1997; Halary et al., 1997).

Les T V γ 9V δ 2 expriment aussi le récepteur inhibiteur ILT2 (LIR-1) ayant pour ligand les molécules de CMH-I classiques HLA-A et B et non classiques HLA-G. Ainsi il a été décrit que la reconnaissance de HLA-G sur des cellules tumorales de mélanome induit une inhibition de la prolifération et de la sécrétion de cytokines par les T V γ 9V δ 2 en présence de P-Ags ce qui interfère avec l'activité anti-tumorale de celles-ci (Lesport et al., 2011).

b) NKR activateurs

La majorité des T V γ 9V δ 2 expriment un NKR activateur appartenant à la famille des lectines de type C : le NKG2D. C'est un récepteur de co-stimulation majeur qui a pour ligand les molécules de CMH-I non classiques MICA/MICB et ULBP1-4. Ces molécules sont exprimées lors d'un stress cellulaire et sont présentes sur différents types de cellules tumorales ou infectées comme les cellules infectées par le HCMV (Raulet et al., 2013). Par exemple, une interaction entre NKG2D et la molécule MICA dont l'expression est augmentée sur les cellules dendritiques (CD) lors d'une infection par *Mycobacterium tuberculosis* est à

l'origine d'une augmentation de la réponse T V γ 9V δ 2 en présence de P-Ags (Das et al., 2001a). Le NKG2D est aussi impliqué dans l'activité anti-tumorale des T V γ 9V δ 2. Ainsi, la stimulation de ce corécepteur par différents types de cellules tumorales (cancer du côlon, colorectal, carcinome, mélanome, lymphome, cellules leucémiques) augmente l'activité cytotoxique des T V γ 9V δ 2 (Corvaisier et al., 2005; Groh et al., 1999; Todaro et al., 2009). Dans le cas de lymphomes et de leucémies, ce serait le ligand ULBP1 qui serait reconnu par le NKG2D afin d'augmenter l'activité cytotoxique des T V γ 9V δ 2 (Lanca et al., 2010). Cependant, le rôle exact du corécepteur NKG2D est controversé. Des études démontrent que la stimulation de celui-ci peut induire à lui seul le déclenchement des fonctions effectrices des T V γ 9V δ 2 (Rincon-Orozco et al., 2005) tandis que d'autres équipes n'observent un effet stimulateur de ce récepteur qu'en présence d'une activation du TCR (Nedellec et al., 2010).

Bien que le NKG2D soit décrit comme étant le corécepteur majeur des T V γ 9V δ 2, d'autres NKR activateurs sont exprimés par ces dernières. L'activité régulatrice du récepteur CD94/NKG2C sur les T V γ 9V δ 2 a été décrite récemment. Comme pour le CD94/NKG2A, le CD94/NKG2C a pour ligand la molécule HLA-E. Même si ce corécepteur est peu exprimé par les T V γ 9V δ 2 circulants chez des donneurs sains, une stimulation de celui-ci mène à une prolifération, une production des cytokines IFN- γ et de TNF ainsi qu'une réponse cytotoxique (Angelini et al., 2011).

Un autre NKR est exprimé par les T V γ 9V δ 2 : DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1/CD226). DNAM-1, via la reconnaissance de son ligand CD155 (Nectin-like 5), est impliqué dans la cytotoxicité des T V γ 9V δ 2 contre des cellules de carcinomes hépatocellulaires (Toutirais et al., 2009).

Certains T V γ 9V δ 2 expriment un récepteur appartenant à la famille des NCR, décrit dans l'activation des cellules NK, le NKp44. Ce récepteur a différents types de ligands qui sont PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), MLL5 (Mixed-Lineage Leukemia-5) et des hémagglutinines présents à la surface de certains virus tels que le virus Influenza ou le Poxvirus. Il a été décrit que ce récepteur NKp44 serait impliqué dans l'activité cytotoxique des T V γ 9V δ 2 contre des cellules de myélome multiple (von Lilienfeld-Toal et al., 2006).

2. TLR

Les TLR, appartenant à la famille des PRR, sont exprimés par de nombreux types cellulaires dont les T V γ 9V δ 2 fraîchement isolés de sang périphérique de donneurs sains. Leur stimulation sur les T V γ 9V δ 2 de façon générale entraîne un signal activateur qui, en parallèle d'une stimulation du TCR, va entraîner le déclenchement de fonction effectrices diverses par ces cellules. Certains clones de T V γ 9V δ 2 expriment les TLR-2, 3 et 5 (Beetz et al., 2008).

La stimulation du TLR-3 par un ligand synthétique Poly (I : C), en présence d'une activation du TCR, induit une augmentation de la sécrétion de cytokines telles que l'IFN- γ et le TNF et des chimiokines par les T V γ 9V δ 2 (Beetz et al., 2008; Wesch et al., 2006). Il a aussi été démontré que la stimulation du TLR-2 et du TLR-5 (par leurs ligands respectifs le lipopeptide Pam₃Cys et la flagelline) en parallèle d'une stimulation du TCR induit quant à elle une augmentation de la production de d'IFN- γ et d'IL-8 par ces cellules (Pietschmann et al., 2009).

3. Fc Récepteurs (FcR):

Certains T V γ 9V δ 2 expriment des récepteurs aux Fc des Ig (Fc γ RIIIA /CD16), exprimés également par les cellules NK et impliqués dans leur activité cytotoxique par ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity). Ainsi il a été démontré qu'après une activation du TCR par des P-Ags, la stimulation de ce récepteur entraîne une augmentation de la production de TNF (Lafont et al., 2001). De plus, il a été démontré que la stimulation du FcR sur les T V γ 9V δ 2 augmente leur activité cytotoxique en présence de cellules de neuroblastomes *in vitro* et des cellules de lymphomes (Daudi, Raji) (Fisher et al., 2014; Tokuyama et al., 2008). Ces propriétés ont été particulièrement utilisées dans le cas d'immunothérapie ayant pour cibles des cellules tumorales. Nous verrons plus en détail ces propriétés par la suite (partie II. D. 1.).

4. Molécules d'adhérence

L'efficacité d'activation des fonctions effectrices des T $\gamma\delta$, comme celle de la plupart des lymphocytes, nécessite des récepteurs de surface autres que le TCR, en particulier des molécules d'adhésion. Ainsi les T V γ 9V δ 2 expriment des molécules d'adhésion telles que LFA-1, CD2 et CD6.

LFA-1 appartient à la famille des intégrines et est exprimé par des lymphocytes B, T ainsi que des cellules de l'immunité innée. Ce récepteur a pour ligand la molécule ICAM-1 qui est surexprimée par des lignées tumorales. Ainsi, en présence d'un traitement ABP, la reconnaissance d'ICAM-1 exprimé par ces cellules tumorales favorise l'activation des T V γ 9V δ 2 (Benzaid et al., 2012; Kato et al., 2003).

Les T V γ 9V δ 2 expriment aussi la molécule CD2, appartenant à la superfamille des Ig, et qui a pour ligand LFA-3. L'interaction entre CD2 et LFA-3 augmente l'activité cytotoxique et la sécrétion de TNF par des clones de T V γ 9V δ 2 lorsqu'ils sont en co-culture avec des cellules cibles traitées par des P-Ags (Wang and Malkovsky, 2000).

Le CD6, un membre de la famille des récepteurs « Scavenger », décrit à la surface des lymphocytes T et B, est impliqué dans l'activation des T V γ 9V δ 2 par des cellules tumorales

traitées par des P-Ags, via son interaction avec la molécule CD166 (Kato et al., 2006). Ce récepteur jouerait davantage un rôle de corécepteur en augmentant le signal TCR de ces lymphocytes.

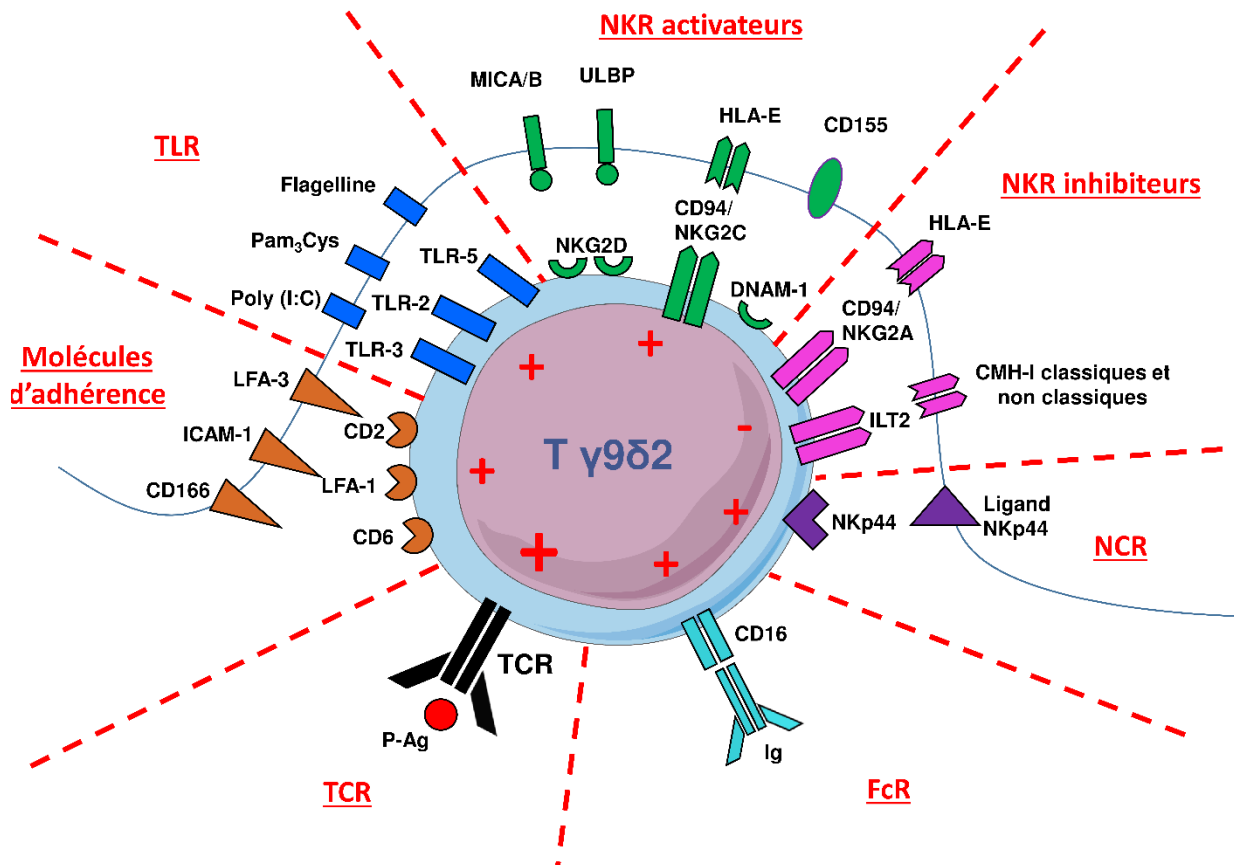


Figure 13 : Les différents récepteurs impliqués dans la régulation de l'activation des T $\gamma\delta 2$. Les récepteurs appartenant à la famille des NKR activateurs, NCR, TLR, FcR, molécules d'adhérence, et le TCR induisent des signaux activateurs (+) aux T $\gamma\delta 2$. Les récepteurs appartenant à la famille des NKR inhibiteurs induisent des signaux inhibiteurs (-) aux T $\gamma\delta 2$.

D. Fonctions effectrices des TVy9Vδ2

Il est connu depuis de nombreuses années que les T Vγ9Vδ2 ont une activité antibactérienne contre *Mycobacterium tuberculosis*, grâce à la mise en évidence des premiers P-Ags stimulants issus de ces bactéries, TUBag 1-4 (TUBag 1 étant le HDMAPP). Depuis, il a été montré que ces cellules sont capables de reconnaître le HDMAPP produit par un grand nombre de bactéries et parasites: *Escherichia Coli*, *Brucella*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Campylobacter*, *Francisella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Yersinia*, aussi bien que *Plasmodium* et *Toxoplasma* (Eberl et al., 2003).

Les T Vγ9Vδ2 ont particulièrement été étudiés pour leurs propriétés anti-tumorales, et plus récemment, pour leurs propriétés antivirales. Dans ce cas, les T Vγ9Vδ2 reconnaissent des P-Ags endogènes produits par la voie du MVA des cellules cibles. De nombreuses études montrent qu'après une stimulation par des P-Ags, les T Vγ9Vδ2 périphériques engagent une réponse de type Th1 caractérisée par une production de cytokines IFN-γ et de TNF ainsi qu'une activité cytotoxique (Dunne et al., 2010).

1. Immunité anti-tumorale

Les cellules immunitaires présentes dans le microenvironnement tumoral peuvent influencer la progression et le devenir des tumeurs. En effet, différentes sous-populations de cellules immunitaires présentes dans ce microenvironnement participent au contrôle et à l'élimination des cellules cancéreuses. Les T γδ contribuent à cette immunité et cela a été démontré face à différents types de cancers tels que les lymphomes, les myélomes, les mélanomes, les cancers du sein, du colon, du poumon, des ovaires, du rein et de la prostate (Lafont et al., 2014). Ces cellules peuvent agir directement par cytotoxicité et par la production de cytokines agissant contre les cellules tumorales, ou indirectement en stimulant et/ou régulant les fonctions effectrices d'autres cellules telles que les cellules dendritiques ou les T CD8+ qui sont requises pour l'initiation et le maintien d'une réponse immunitaire efficace.

Les T Vγ9Vδ2 sont capables de reconnaître spécifiquement les cellules tumorales par différents mécanismes qui vont en particulier dépendre du type de tumeurs :

- Dans les cellules saines, la concentration d'IPP produit par la voie MVA est trop faible pour être détectée par les T Vγ9Vδ2. Cependant, il est observé une dérégulation de cette voie dans certains types de cellules tumorales menant à une surproduction d'IPP qui peut être ainsi reconnue par les T Vγ9Vδ2 (Gober et al., 2003; Uchida et al., 2007). De façon similaire, le traitement de cellules tumorales par des ABP entraîne une accumulation d'IPP plus importante

que dans des cellules saines ce qui les rend stimulantes pour les T V γ 9V δ 2 (Dhar and Chiplunkar, 2010; Mattarollo et al., 2007).

- Les cellules tumorales sont capables de moduler l'expression de certains ligands des récepteurs NKR décrits sur les T V γ 9V δ 2. En effet, certaines cellules tumorales ont une surexpression des molécules MIC et ULBP ce qui entraîne une activation de la sécrétion d'IFN- γ , et de TNF ainsi qu'une activité cytotoxique par la stimulation du récepteur NKG2D (Das et al., 2001a; Rincon-Orozco et al., 2005). Par exemple, les molécules ULBP sont augmentées sur des cellules de leucémies, ou de lymphomes et également sur des cellules issues de tumeurs solides telles que les carcinomes du colon ou des ovaires (Deniger et al., 2014; Lanca et al., 2010). L'expression d'autres ligands de NKR est modulée dans les cellules tumorales : l'expression du ligand de DNAM-1 (CD155) est augmentée dans certaines tumeurs, ce qui induit une activation des T V γ 9V δ 2 en coopération avec un stimulus du TCR et du NKG2D (Toutirais et al., 2009). A l'inverse, des ligands de NKR inhibiteurs peuvent être moins exprimés par les cellules tumorales comme des molécules de CMH classiques et non classiques.

- D'autres récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance des cellules tumorales tels le récepteur CD16 (Fc γ RIIIA). En effet, les T V γ 9V δ 2 peuvent être activés par les Ig monoclonales thérapeutiques utilisées pour le traitement de certains cancers à travers une activité ADCC médiée par leur CD16 (Gertner-Dardenne et al., 2009). Ces données ont été renforcées par une étude chez l'Homme dans laquelle il a été montré que les T V γ 9V δ 2 augmentent l'efficacité du traitement à base d'Ig (Trastuzumab) dirigées contre la protéine HER2 (récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain) chez des patients atteints de cancer du sein (Capietto et al., 2011). De plus, la combinaison d'une amplification *ex vivo* des T V γ 9V δ 2 CD16+ et le traitement par des Ig monoclonales (Rituximab et Trastuzumab dirigées contre HER2 et CD20) induit une augmentation de l'activité cytotoxique des T V γ 9V δ 2 par ADCC, ce qui permet de cibler les cellules tumorales résistantes au traitement Ig seul (Tokuyama et al., 2008).

Par conséquent, les T V γ 9V δ 2 sont capables de répondre face à des cellules tumorales par la production de cytokines de types pro-inflammatoires et/ou par une activité cytotoxique. Cette réponse est variable et implique différents récepteurs selon le type de tumeur.

Suite à ces travaux sur le potentiel anti-tumoral des T V γ 9V δ 2 *in vitro*, des études *in vivo* ont été entreprises. Les T V γ 9V δ 2 étant absents chez la souris, les études précliniques ont été limitées à des études utilisant des souris immunodéficientes (SCID) xénogreffées par des tumeurs humaines et dans lesquelles ont été injectées des T V γ 9V δ 2 humains amplifiés avec un P-Ags ou des ABP et de l'IL-2. Ainsi il a été observé une caractéristique importante

de ces lymphocytes principalement localisés dans le sang périphérique : leur capacité d'infiltration des tumeurs. Après injection de T V γ 9V δ 2 dans des souris xénogreffées avec des tumeurs de sein ou des carcinomes de la vessie, il a été observé une infiltration de T V γ 9V δ 2 et une inhibition de la progression des tumeurs (Capietto et al., 2011; Yuasa et al., 2009). Ceci est corrélé avec une diminution de cette population dans le sang périphérique. D'autres études ont été réalisées à partir de souris xénogreffées avec des tumeurs de mélanome ou d'adénome pancréatique avec des résultats similaires: diminution de la progression de la tumeur et augmentation de la survie des souris (Kabelitz et al., 2004). Il a également été montré que les T V γ 9V δ 2 peuvent infiltrer des xénogreffes tumorales mammaires humaines et freiner la croissance de ces tumeurs *in vivo* chez la souris (Benzaid et al., 2012; Benzaid et al., 2011)

Ces démonstrations *in vitro* et *in vivo* du potentiel anti-tumoral des T V γ 9V δ 2 ont amené à mettre au point des protocoles d'immunothérapies anti-cancéreuse chez l'Homme à partir de ces lymphocytes. Ainsi des essais cliniques ont été entrepris utilisant soit des P-Ags synthétiques BrHPP (Phosphostim) soit des ABP. Différentes stratégies ont été réalisées sur des patients atteints de cancers hématologiques ou des tumeurs solides (**Figure 14**) (Fournie et al., 2013) :

- Transfert adoptif de T V γ 9V δ 2 autologues préalablement amplifiés *ex vivo* par des P-Ags ou des ABP et en présence d'IL-2 (**Figure 14A**) ;
- Pas d'amplification *ex vivo* mais une amplification directement *in vivo* par l'administration au patients de P-Ags ou d'ABP ainsi que de l'IL-2 (**Figure 14B**).

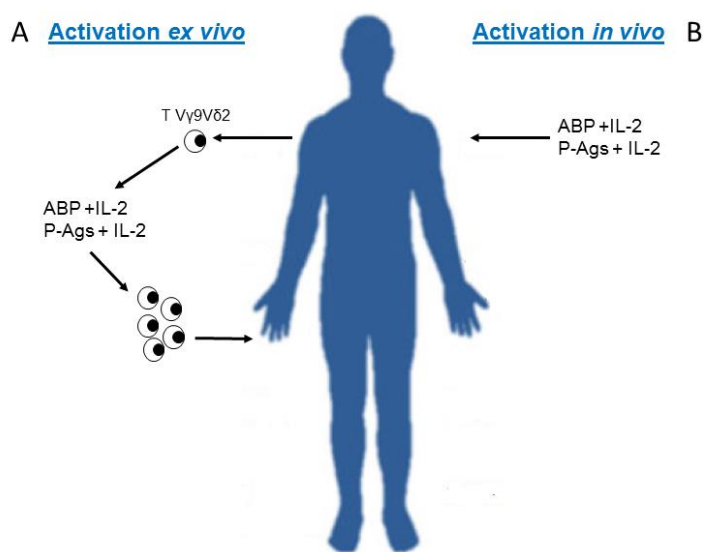


Figure 14 : Stratégies d'immunothérapie anticancéreuse utilisant les T V γ 9V δ 2. Modifiée d'après (Castella et al., 2011))

Des résultats cliniques encourageants ont montré globalement une bonne tolérance des traitements et un ralentissement de la progression tumorale dans certains cas. Cependant, un grand nombre de patients n'ont pas répondu au traitement laissant supposer que des ajustements des protocoles doivent être réalisés (Fournie et al., 2013).

2. Rôle des T V γ 9V δ 2 face à des virus

Parmi les différents types de cellules impliquées dans l'immunité innée, les T $\gamma\delta$ sont connus pour exercer une activité antivirale contre différents virus tels que les rétrovirus, les flavivirus, les paramyxovirus, orthomyxovirus, picornavirus, coronavirus, arénavirus, herpesvirus, hepadnavirus et le virus de l'orthopoxvirus (Poccia et al., 2005). Alors que ce sont majoritairement les T V δ 2 négatifs (V δ 2neg) qui sont décrits pour leurs propriétés antivirales, les T V γ 9V δ 2 sont de plus en plus étudiés pour un potentiel antiviral similaire grâce à l'utilisation des P-Ags ou des ABP. Ainsi l'activité des T V γ 9V δ 2 a été notamment étudiée lors d'infection par le coronavirus, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), virus de l'hépatite C (HCV), le virus de la grippe (Influenza) et le virus d'Epstein-Barr (EBV).

a) Coronavirus

Le syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) est causé par une nouvelle souche de Coronavirus (SARS-CoV). Chez les patients atteints du SRAS, il a été montré une expansion de la population T V γ 9V δ 2 associée à un fort taux d'Ig anti-SARS-CoV, 3 mois après le début des premiers symptômes (Poccia et al., 2006). Des expériences de co-culture *in vitro* démontrent que les T V γ 9V δ 2 pré-activés en présence de P-Ags sont capables d'inhiber la réplication virale du coronavirus (Poccia et al., 2006). Cette inhibition est en partie induite par la production d'IFN- γ . Cependant, à l'heure actuelle, aucune étude n'a confirmé cette observation *in vivo*.

b) VIH

Le VIH est un rétrovirus responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) chez l'Homme. Il est observé une inversion du rapport V δ 1+/V δ 2+ circulants (augmentation du nombre de T V δ 1+ associé à une diminution du nombre de T V δ 2+) chez des patients infectés par le VIH (De Paoli et al., 1991; Poccia et al., 1996). D'après une étude menée sur le macaque, il semblerait que cette expansion de T V δ 1+ soit une conséquence indirecte de l'infection virale et reflète une augmentation de translocation de produits bactériens dans l'épithélium intestinal (Harris et al., 2010). Il a été montré que les T V δ 1+ induisent la lyse des cellules infectées par une reconnaissance via les récepteurs NKp30 et CD94/NKG2C (Fausther-Bovendo et al., 2008; Hudspeth et al., 2012). Cependant ces

lymphocytes T V δ 1+ sont aussi capables de lyser des cellules non infectées ce qui a pour conséquence qu'à l'heure actuelle, nous ne savons pas si ces cellules accélèrent ou ralentissent la progression virale du VIH (Sindhu et al., 2003). De plus, le fait que l'antigène reconnu par les T $\gamma\delta$ ne soit pas connu limite les études potentielles d'immunothérapie.

En parallèle de cette expansion de T V δ 1+, le nombre de T V δ 2+ a tendance à diminuer chez des patients atteints du VIH (sans traitement) avec des déclin importants chez les personnes à un stade d'infection tardif ayant une forte diminution du pool T CD4+, une virémie élevée et l'apparition d'infections opportunistes (Hermier et al., 1993). De plus, cette inversion du rapport V δ 1+/V δ 2+ fait partie des événements précoces de la maladie VIH au stade où le rapport T CD4/ T CD8 n'a pas encore été affecté. Des études ont montré que cette déplétion en T V δ 2+ est associée à une anergie fonctionnelle de ces cellules qui se manifeste par une diminution de la prolifération et de la sécrétion de cytokines après stimulation par des antigènes bactériens ou des cellules tumorales (Poccia et al., 1996; Wallace et al., 1997). Cependant, ces cellules pourraient avoir un rôle intéressant car il a été observé d'une part une expansion rapide juste après une infection chez les macaques, suivi d'un rapide déclin, et d'autre part, elles développent *in vitro* un effet antiviral (Gan et al., 1995). En effet, ces cellules seraient impliquées dans l'immunité anti-VIH en particulier par la production de chimiokines et cytokines (RANTES et d'autres) qui permettent de bloquer l'entrée du virus et/ ou la réplication (Lehner et al., 2000; Poccia et al., 1999). Ainsi, les T V γ 9V δ 2 semblent être une cible intéressante d'immunothérapie, en particulier par l'utilisation d'ABP couplés à de l'IL-2 afin d'augmenter leur nombre et leurs fonctions effectrices. Dans ce but, une étude pilote a été menée utilisant du zolédronate et de l'IL-2 (Poccia et al., 2009). Cette approche n'a montré aucun effet délétère important pour les patients. Il a été observé une expansion de T V γ 9V δ 2 matures et activés ainsi qu'une augmentation de cellules dendritiques matures et de TCD8+ fonctionnels, ce qui irait dans le sens d'une restauration de réponses immunitaires innées et adaptatives. Toutefois, cette étude doit être répétée et confirmée pour son utilisation en immunothérapie anti-VIH (Pauza et al., 2014). Cependant, il a récemment été montré que le traitement par trithérapie (HAART) utilisée chez les patients atteints du VIH altère les fonctions effectrices des T V γ 9V δ 2 ce qui complique l'utilisation d'une immunothérapie utilisant ces cellules (Casetti et al., 2015).

c) HCV

Le HCV appartient à la famille des *flaviviridae* et est responsable d'hépatites pouvant entraîner une cirrhose chez l'Homme. De façon comparable aux infections par le VIH, il est observé une diminution du nombre de T V δ 2+ circulant chez des patients atteints d'infections chroniques par le HCV (Par et al., 2002). Cette population, préalablement stimulée en

présence des P-Ags (IPP, BrHPP) ou des ABP (zolédronate), entraîne l'inhibition de la réplication virale du HCV *in vitro* (Agrati et al., 2006). Cette activité antivirale serait médiée par la production d'IFN- γ et non à une activité cytotoxique directe. A l'heure actuelle aucune étude *in vivo* n'a été faite quant à ce potentiel antiviral des T V γ 9V δ 2 en présence de HCV. Cependant, il pourrait être intéressant d'essayer de cibler spécifiquement les T V γ 9V δ 2, en particulier par l'utilisation d'ABP couplés à de l'IL-2, comme décrit précédemment dans le cas des infections par le VIH.

d) Virus de la grippe

Il a récemment été mis en évidence un rôle antiviral des T V γ 9V δ 2 contre le virus Influenza. Les T V γ 9V δ 2 pré-activés avec de l'IPP ou des ABP (pamidronate) *in vitro*, présentent une activité cytotoxique en présence de Macrophages dérivés de monocytes ou de cellules épithéliales alvéolaires infectées par différentes souches d'Influenza (H1N1, H9N2) *in vitro* (Li et al., 2013; Qin et al., 2009). Dans ce contexte, les T V γ 9V δ 2 pré-activés sont capables d'induire la mort des cellules infectées par contact direct avec celles-ci, via l'activation du récepteur NKG2D. Cette activité cytotoxique implique une dégranulation de Perforine/Granzyme ainsi que le système Fas-Fas ligand. De plus, ces cellules sont aussi capables d'inhiber la réplication virale via la production d'IFN- γ (Qin et al., 2011). Enfin, il est observé une diminution de la sévérité des pathologies associées à l'infection par le virus Influenza de souris humanisées (souris Rag-/- γ c-/- reconstituées avec des PBMC humains) infectées lorsqu'elles sont traitées par des ABP (pamidronate) *in vivo* (Tu et al., 2011). En effet, le traitement par des ABP diminue la perte de poids, l'inflammation des poumons et augmente la survie de ces souris. Cet effet n'est pas observé lorsque les T V γ 9V δ 2 sont préalablement déplétés des PBMC, supposant donc que ceux-ci ont un rôle majeur dans la diminution de la sévérité de la maladie observée. Par conséquent, les T V γ 9V δ 2 pré-activés par des P-Ags ou des ABP pourraient avoir une activité antivirale contre le virus Influenza (Tu et al., 2011).

e) EBV

Des résultats similaires à ceux décrits lors d'infections par Influenza ont été observés en présence du virus EBV (Xiang et al., 2014). Des T V γ 9V δ 2 amplifiés avec des ABP (Pamidronate) *in vitro* sont capables de lyser spécifiquement des cellules transformées par EBV grâce à la stimulation du récepteur NKG2D et leur TCR $\gamma\delta$ menant à une activité cytotoxique médiée par Fas et TRAIL. De plus, les auteurs ont démontré une activité des T V γ 9V δ 2 *in vivo* à partir de souris immunodéficientes et humanisées. En effet, chez des souris immunodéficientes (Rag-/- γ c-/-) qui ont été inoculées avec des cellules tumorales transformées par EBV, le transfert de T V γ 9V δ 2 (amplifiés *in vitro* à partir de Pamidronate)

induit une régression de la tumeur et des complications associées. Des résultats similaires ont été observés à partir de souris humanisées (reconstituées avec des PBMC humains). Ainsi cette étude, démontre un potentiel anti-EBV des T V γ 9V δ 2 suite à un traitement par des ABP.

CHAPITRE 2 :

Le Cytomégalovirus humain

I. Généralités sur le HCMV

A. Généralités

1. Historique

Au début du XX^{ème} siècle, Dr Ribbert ainsi que Jesionek et Kiolemenoglou ont décrit pour la première fois la présence de cellules dites « cytomégaliqes » au niveau de différents organes (reins, foie, poumons et glandes salivaires) issus d'autopsies d'enfants mort-nés. Ils ont alors désigné cette pathologie : la « maladie des inclusions cytomégaliqes ». En 1930 puis en 1950, des inclusions cytomégaliqes ont aussi été retrouvées dans les vaisseaux sanguins issus du cordon ombilical de nouveau-nés décédés. En 1955, l'équipe de Weller a fait la corrélation entre les différents symptômes de cette maladie et la présence de cellules présentant ces inclusions cytomégaliqes dans les urines des patients. De plus, ils ont observé que ces cellules étaient caractérisées par des inclusions virales nucléaires et cytoplasmiques par microscopie électronique. Ils ont alors identifié ce virus comme l'agent responsable de cette maladie. Après avoir réussi à isoler ce virus pour la première fois en 1956, Weller décide de nommer cet agent infectieux « Cytomégalovirus » en raison de l'augmentation de la taille des cellules infectées observée. Deux autres groupes ont isolé le virus dans les années 50, l'équipe de Smith et de Rowe (1956) (**Figure 15**). Dans les années 1970, le lien entre l'infection lors de la grossesse et les séquelles neurologiques chez le nouveau-né est mis en évidence, ainsi que la corrélation entre la baisse des défenses immunitaires et la réactivation virale. A ce jour le cytomégalovirus reste un problème de santé publique chez les personnes immunodéprimées et lors d'infection congénitale.

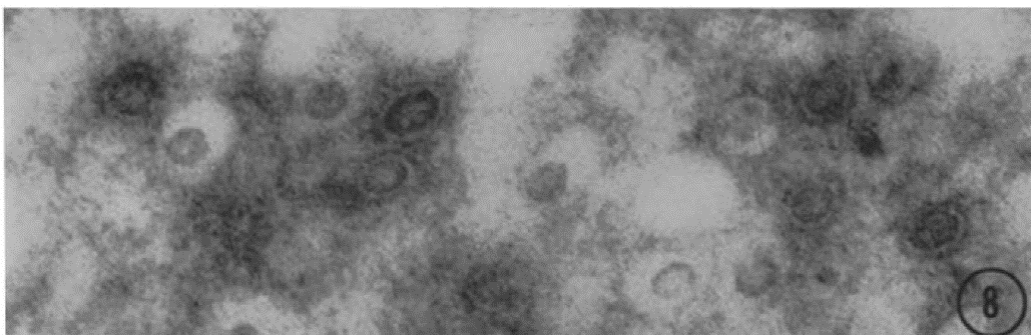


Figure 15 : Inclusions nucléaires de fibroblastes infectés par une souche humaine de HCMV isolée par l'équipe de MG Smith en microscopie électronique (x60 000) (Luse and Smith, 1958)

2. Classification

Les Herpesvirus, appartenant à la famille des *Herpesviridae*, ont co-évolué avec leurs hôtes vertébrés depuis plus de cent millions d'années (McGeoch et al., 2000). La famille des *Herpesviridae* comporte 3 sous-familles : les α -, β - et γ -herpesvirinae (**Tableau 5**). Les virus appartenant à cette famille sont caractérisés par leur capacité à produire des infections latentes et persistantes tout au long de la vie de l'individu. De plus, les herpesvirus ont tous la même composition : un génome d'ADN linéaire double brin de taille relativement importante, encapsulé dans une capside icosaédrique, elle-même enveloppée dans une bicouche lipidique, l'enveloppe.

Le cytomégalovirus humain (HCMV), aussi appelé *human herpesvirus 5* (HHV-5), appartient à la sous famille des β -herpesvirinae des *Herpesviridae*. Les β -herpesvirinae ont pour particularité d'avoir un cycle réplcatif long comparé aux autres sous familles, ainsi que d'établir une latence dans les leucocytes. Tout comme le virus EBV, les herpesvirus humain de type 1, 6, 7, et 8, le HCMV est capable de se réactiver de façon périodique et d'entraîner la production de nouveaux virions infectieux. Ce virus a un spectre d'hôte restreint à une seule espèce, l'Homme, mais a un tropisme large car il peut infecter une grande variété de types cellulaires comme les fibroblastes, les trophoblastes placentaires, les cellules épithéliales, endothéliales, les macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles, les hépatocytes, les cellules stromales médullaires, les cellules musculaires lisses, mais aussi des cellules du système nerveux central tels que les neurones, les astrocytes et les cellules progénitrices neuronales. (Luo et al., 2008; Mocarski et al., 2007b) . De plus, le HCMV est capable d'établir une latence dans les cellules des lignées myéloïdes telles que les monocytes et leurs précurseurs hématopoïétiques CD34+, et dans les cellules endothéliales.

Herpesvirus	Abbreviation		Size (kb)
	Common	Formal	
<i>Alphaherpesvirinae</i>			
<i>Simplexvirus</i>			
Herpes simplex virus type 1	HSV-1	HHV-1	152
Herpes simplex virus type 2	HSV-2	HHV-2	155
<i>Varicellovirus</i>			
Varicella-zoster virus	VZV	HHV-3	125
<i>Betaherpesvirinae</i>			
<i>Cytomegalovirus</i>			
HCMV	HCMV	HHV-5	227–236
<i>Roseolovirus</i>			
Human herpesvirus type 6	HHV-6	HHV-6	159–162
Human herpesvirus type 7	HHV-7	HHV-7	144–153
<i>Gammaherpesvirinae</i>			
<i>Lymphocryptovirus</i>			
EBV	EBV	HHV-4	172–173
<i>Rhadinovirus</i>			
Human herpesvirus type 8	HHV-8	HHV-8	134–138

Tableau 5 : Classification des Herpesvirus de la famille des *Herpesviridae* (Crough and Khanna, 2009)

B. Epidémiologie

L'Homme est le seul réservoir du HCMV. Ce virus touche la population mondiale avec une répartition qui varie selon les zones géographiques sans variations saisonnières. Ainsi le HCMV a une séroprévalence de 30 à 70% dans les pays développés et de 80 à 100% dans les pays en développement. En France, la séroprévalence est de 50-60%. Cette prévalence varie dans la population selon différents critères : l'âge, le sexe et les facteurs socio-économiques. En effet, la prévalence augmente avec l'âge et on observe deux pics d'incidence : l'un durant l'enfance entre 0 et 5 ans, puis l'autre pendant l'adolescence et chez le jeune adulte (entre 15 et 20 ans). De plus, les personnes nées dans des pays sous-développés ou en développement ont une primo-infection plus précoce par le HCMV en particulier en raison des conditions sanitaires. Le HCMV a pour particularité de persister dans l'organisme tout au long de la vie de l'individu : la personne une fois infectée, est dite séropositive pour le HCMV. Ainsi, chez un individu séropositif, le virus reste sous forme latente et pourra se réactiver de façon périodique suite à certains stimuli.

Le HCMV se transmet uniquement par contact étroit car c'est un virus particulièrement fragile dans le milieu extérieur. Ainsi, le HCMV peut se transmettre par contact direct avec les fluides corporels tels que la salive, les larmes, les urines, le sang, le sperme et les sécrétions cervicales d'un individu séropositif. La contamination par voie sexuelle est un mode de transmission majeur qui explique le pic d'incidence d'infection obtenu chez le jeune adulte (Coonrod et al., 1998).

Le HCMV peut aussi se transmettre de la mère à l'enfant. C'est le mode de contamination le plus répandu. Cette transmission peut s'effectuer durant la grossesse *in utero* par voie trans-placentaire, mais aussi lors de l'allaitement à travers le lait maternel. Cette contamination peut s'effectuer dans deux cas principalement : si la mère est séropositive avant la grossesse ou bien si la mère séronégative et est infectée durant sa grossesse (particulièrement à risque lors du premier trimestre). Une ré-infection de la mère séropositive peut aussi être à l'origine d'une transmission du virus au fœtus. On compte 20 000 à 40 000 cas d'infections congénitales ou néonatales chaque année dans les pays développés. Il est décrit que le risque de primo-infection pendant la grossesse est d'environ 2% avec un risque de transmission au fœtus de moins de 40% (Griffiths et al., 2015). De plus, 1% des mères séropositives avant leur grossesse ont un nouveau-né ayant subi une infection congénitale par le HCMV (Griffiths et al., 2013). En 2007, une revue a été publiée regroupant les données épidémiologiques de 15 études faites dans des pays industrialisés sur les infections congénitales et néonatales par le HCMV (Dollard et al., 2007). D'après ces données, il est détecté du HCMV dans les urines de moins de 1% des nouveau-nés. Sur ces nouveau-nés infectés, seulement 12.7% ont des symptômes associés au HCMV à la naissance. De plus, 32% des mères séropositives transportent du HCMV dans leur lait maternel et 69% des nourrissons sont ainsi infectés suite à l'allaitement (Hamprecht et al., 2008).

Dans les pays développés un troisième mode de transmission existe lors des transplantations d'organes : la transmission iatrogène. En effet, lorsque le donneur d'organes est séropositif, le virus peut être transmis à l'individu receveur. Environ 80% des donneurs séropositifs transmettent du HCMV au receveur d'organe hépatique ou rénal (Atabani et al., 2012). De plus, les personnes transplantées sont généralement sous immunosuppresseurs, ce qui est corrélé à un risque plus important de réactivation virale (Mori et al., 2004).

C. Pathologies associées aux infections HCMV

Le HCMV n'est pas à l'origine de graves pathologies chez un individu sain, principalement en raison d'une réponse efficace du système immunitaire. Par contre, chez une personne ayant un système immunitaire peu fonctionnel tel que les individus immunodéprimés (personnes transplantées ou bien atteintes du SIDA), les fœtus et les nouveau-nés, le HCMV peut entraîner de graves pathologies.

1. Infection d'individus sains immunocompétents

La primo-infection d'un individu sain est généralement asymptomatique. Dans certains cas, le HCMV peut entraîner des symptômes cliniques de type mononucléose (fièvre et myalgies) (Mocarski et al., 2007a). Dans de rares cas, le HCMV peut causer des pneumopathies, hépatites, myocardites, arthrites, arthralgies ou des maladies gastro-intestinales chez des patients sains (**Figure 16**).

2. Infection d'individus immunodéprimés

a) Personnes transplantées d'organe solide

L'infection par le HCMV est une cause majeure de complication chez les personnes transplantées, en particulier chez les individus transplantés de reins (Lucia et al., 2014). Ainsi, l'infection par HCMV est l'infection virale la plus fréquente en transplantation rénale. Malgré un dépistage, il est en pratique difficile de limiter la transplantation d'organes entre donneur et receveur en fonction de leur statut HCMV. Par conséquent, le HCMV reste une cause importante de morbidité lors de transplantation, malgré des traitements et une surveillance accrue des patients. Les complications du HCMV sont plus importantes dans le cadre de transplantation donneur séropositif / receveur séronégatif. Ces patients manifestent des complications telles que de la fièvre, une leucopénie, une arthralgie ainsi que des hépatites, pneumopathies, myocardites, arthrites, entérocolites, pancréatites en fonction de l'organe transplanté. L'apparition de ces pathologies est corrélée avec une présence de HCMV dans le sang et les organes concernés. De plus, le HCMV est impliqué dans des dommages indirects sur les patients transplantés comme le rejet d'allogreffes aigus ou chroniques (Sagedal et al., 2002).

b) Personnes transplantées de cellules souches hématopoïétiques

L'infection par le HCMV est plus fréquente dans le cas de transplantation de cellules souches hématopoïétiques que lors de transplantation d'organe solide. Ceci est

principalement dû à la réactivation de virus latent présent dans les cellules souches hématopoïétiques de donneurs séropositifs (Castro-Malaspina et al., 2002). Dans le cas d'une transplantation donneur séropositif / receveur séronégatif, le risque d'infection du patient transplanté est d'environ 17%. Dans les 100 premiers jours après la transplantation, l'infection par HCMV est souvent responsable de pneumopathie et d'entérocolite, avec par exemple une mortalité allant de 60-80% sans traitement après une pneumopathie. A l'heure actuelle les traitements antiviraux limitent considérablement les complications associées au HCMV et augmentent de façon significative la survie des patients transplantés (Crough and Khanna, 2009).

c) Personnes infectées par le VIH

L'infection par le HCMV reste une des infections virales les plus répandues chez les patients atteints du SIDA. La manifestation la plus fréquente est l'apparition de rétinite. Avant la mise en place de la trithérapie antivirale (HAART), 25% des patients atteints du SIDA développaient des rétinites pouvant aller jusqu'à la cécité. Aujourd'hui, son incidence a considérablement diminué grâce aux traitements antiviraux. En effet, l'utilisation de la trithérapie a permis de réduire la charge virale de VIH mais aussi celle du HCMV avec les complications qui lui sont associées (Foca et al., 2012). D'autres pathologies induites par l'infection HCMV peuvent être observées chez ces patients telles que des entérocolites, gastrites, œsophagites, hépatites, encéphalopathies...

3. Infection congénitale et néonatale

L'infection congénitale à HCMV est l'une des causes les plus importantes de séquelles à long terme chez les nouveau-nés. Elle peut être responsable de morbidité et mortalité chez le nouveau-né. En effet, lors d'atteintes précoces durant la grossesse, l'infection peut entraîner la mort *in utero* du fœtus. Dans les pays développés, 13 % des nouveau-nés infectés ont des symptômes cliniques associés au HCMV à la naissance parmi lesquels environ 50% développeront des séquelles permanentes (Dollard et al., 2007). En France, environ 5 à 10% des enfants infectés *in utero* naissent avec des anomalies. Le HCMV peut entraîner de graves anomalies neuro-développementales telles que des microcéphalies, encéphalites, lissencéphalies, des troubles sensoriels (vue, ouïe) ou bien encore des retards mentaux. La perte d'audition est le symptôme le plus fréquent suite à une infection congénitale à HCMV, elle touche environ 10-15% des nouveau-nés infectés avec des symptômes visibles à la naissance (Dollard et al., 2007). Le risque de développer ce type de pathologie est plus fréquent lors d'infection congénitale chez la mère séronégative que lors de réactivation de virus latent chez la mère séropositive ou bien d'infection périnatale lors de l'allaitement.

D'autres pathologies peuvent être causées par le HCMV tels qu'une jaunisse, une hépatosplénomégalie, et une hépatite chez le nouveau-né. De plus, certaines pathologies peuvent apparaître tardivement, c'est le cas notamment pour la surdité.

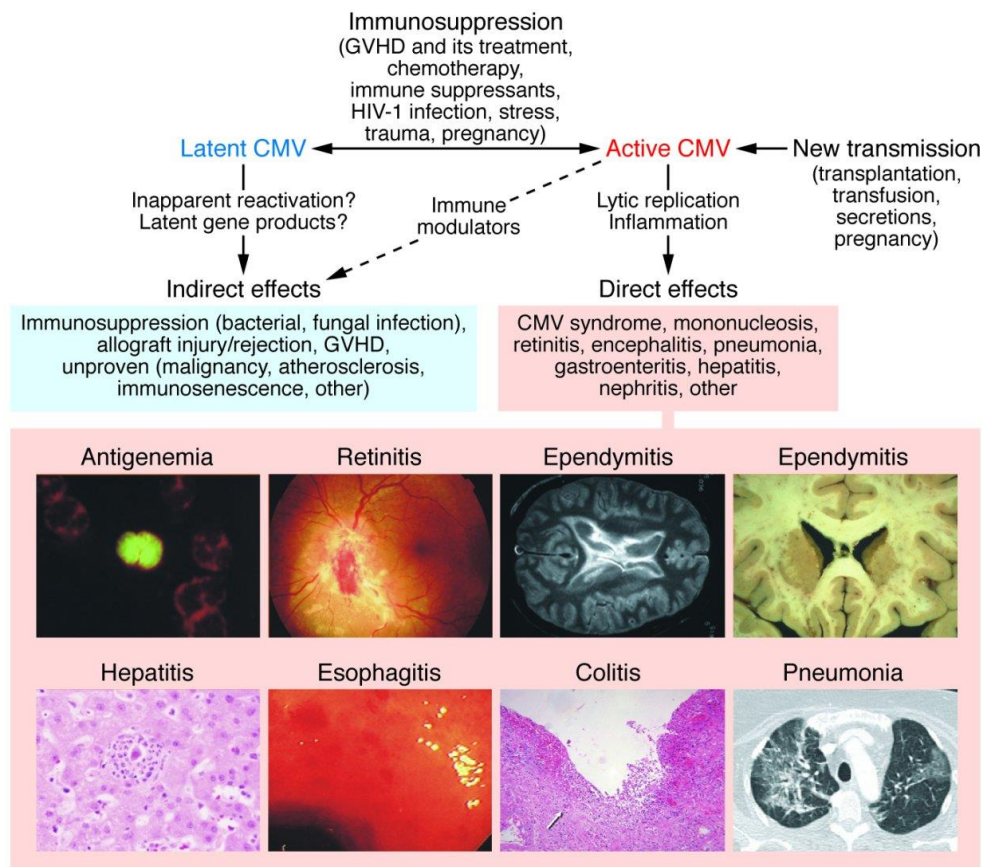


Figure 16 : Manifestations cliniques d'une infection HCMV. Les individus séropositifs possèdent du virus sous forme latente. Le virus peut causer des effets indirects par notamment l'expression de transcrits de latence (Immunosuppression, rejet de greffe et autres). Le virus latent peut aussi être réactivé, dû à une immunosuppression (traitement suite à la greffe, HIV, grossesse et autres) menant à une réplication active du virus qui entraîne l'apparition de maladies associées au HCMV mais aussi des effets indirects décrits précédemment. Une nouvelle transmission (transplantation, transfusion, sécrétion) peut aussi entraîner l'apparition de ces pathologies. Ces maladies associées au HCMV sont : des rétinites (vue ophtalmoscopique d'hémorragie rétinienne), épendymites (inflammation périventriculaire) détectés en IRM (à gauche) et post-mortem (à droite), hépatites (coupe histologique), colites (ulcère profond dans une biopsie de colon), pneumonies (image d'un scan du poulmon) (Boeckh and Geballe, 2011).

4. Implication dans le cancer?

Des données laissent supposer que le HCMV pourrait jouer un rôle dans certains cancers d'origine épithéliale et neuronale. Cependant, les premières données démontrant une détection d'antigènes HCMV dans des coupes histologiques de glioblastome ont fortement été controversées (Cobbs et al., 2002). Depuis des études ont confirmé ces résultats dans d'autres types de cancer tels que les cancers du côlon ou les médulloblastomes (Baryawno et al., 2011). D'autres équipes n'ont montré aucune détection du HCMV, ce qui fait qu'à l'heure actuelle, le sujet reste discuté (Soderberg-Naucleer and Johnsen, 2015). Le rôle précis du HCMV dans le glioblastome multiforme n'est toujours pas clair. A l'inverse d'autres herpesvirus comme le virus d'EBV, il est clair que le HCMV n'est pas un virus oncogène. Cependant, celui-ci pourrait avoir un effet oncomodulateur en jouant un rôle dans l'initiation et la progression des tumeurs (Barami, 2010). Par exemple, la protéine pp71 du HCMV a été décrite comme contribuant à l'angiogenèse observée dans les glioblastomes (Matlaf et al., 2013). Ainsi, le HCMV semblerait être une nouvelle cible thérapeutique dans le cas de certains cancers, notamment dans le cas de glioblastome (Schuessler et al., 2014).

D. Traitements actuels et vaccination

A l'heure actuelle, il existe plusieurs traitements antiviraux efficaces contre le HCMV. Les plus utilisés sont le Ganciclovir, le Valganciclovir, le Foscarnet et le Cidofovir. Ces traitements sont utilisés de façon curative et préventive chez des patients immunodéprimés. Ils ont comme point commun leur cible : l'ADN polymérase virale. Par exemple, le ganciclovir, qui est le traitement antiviral le plus utilisé, est un analogue de guanosine qui est phosphorylé dans la cellule infectée. Une fois triphosphorylé, le ganciclovir exerce son activité par deux mécanismes : inhibition compétitive de l'ADN polymérase et incorporation de celui-ci dans l'ADN viral ce qui a pour conséquence un arrêt de l'élongation et donc de la réplication virale. Malheureusement, l'utilisation prolongée d'antiviraux chez les patients immunodéprimés a mené à l'émergence de mutations sur le génome du HCMV qui sont à l'origine de souches virales résistantes à ces traitements. Ainsi des mutations sont apparues sur la séquence de la kinase UL97 impliquée dans la phosphorylation du ganciclovir. L'ADN polymérase UL54 peut elle aussi être mutée ce qui rend également le virus résistant aux molécules antivirales (Komatsu et al., 2014).

En parallèle de ces traitements antiviraux, il peut être administré des immunoglobulines hyper-immunes anti-HCMV. Celles-ci sont utilisées à but prophylactique et toujours avec les traitements antiviraux nommés précédemment. Ces traitements peuvent être utilisés avant

une transplantation d'organe à risque (donneur séropositif / receveur séronégatif). L'administration de ces immunoglobulines à des patients transplantés de reins diminue l'incidence de complications associées à l'infection par HCMV (Snydman et al., 1987). De plus, celles-ci peuvent aussi être utilisées en prévention pour éviter les transmissions du virus au fœtus lors de l'infection congénitale (Nigro et al., 2005).

Actuellement peu utilisé, le transfert adoptif de lymphocytes T a aussi fait ses preuves pour le traitement de l'infection par HCMV chez les patients transplantés (Crough and Khanna, 2009). En effet, le transfert de clones de T CD4+ ou CD8+ spécifiques du virus (culture de lymphocytes préalable en présence de cellules dendritiques chargées avec des lysats viraux) permet une réponse T efficace contre celui-ci, diminuant significativement la virémie chez les patients (Peggs et al., 2003).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de vaccin contre le HCMV. Le problème réside principalement dans le fait que le virus, persistant tout au long de la vie de l'individu, est difficile à cibler spécifiquement. De plus le virus a mis en place des mécanismes d'échappement contre le système immunitaire. L'utilisation de virus atténués ou bien recombinants a été testée mais sans résultats bénéfiques. Récemment, des entreprises pharmaceutiques essaient de développer des protéines recombinantes du HCMV connues comme étant fortement immunogènes (pp65, gB, IE). Celles-ci sont en cours d'essais cliniques en phase 1 et/ou 2 pour le développement de vaccins. Ces protéines ont été testées sur des mères séronégatives et chez des patients avant une transplantation de rein ou de foie. Ainsi, un vaccin utilisant une protéine recombinante gB protège environ 50% des mères séronégatives et il a été observé une diminution de la charge virale chez les patients transplantés (Lilja and Mason, 2012). Cet effet serait obtenu en particulier par une stimulation de la production d'immunoglobulines anti-HCMV dans l'organisme. Cependant, bien que le vaccin stimule le système immunitaire, nous ne savons pas actuellement s'il protège de l'infection intra-utérine durant la grossesse et/ou bien de la réactivation virale (Griffiths et al., 2013). Des essais cliniques en phases 2 et 3 pour ces potentiels vaccins sont en cours.

E. HCMV et immunosénescence

Le HCMV latent peut se réactiver, entraînant une infection chronique durant laquelle le virus est à nouveau produit à un bas niveau pendant des périodes de temps prolongées. Chez un individu immunocompétent, cet état d'infection chronique se produit par intermittence et est accompagné de changements substantiels phénotypiques des lymphocytes T spécifiques du HCMV. Chez les personnes âgées, il est observé une forte augmentation de la proportion de

T CD4+ et T CD8+ mémoires spécifiques du HCMV, pouvant atteindre près de 50% du répertoire lymphocytaire. Ainsi le HCMV aurait un rôle important dans l'immunosénescence (altérations immunitaires chez les personnes âgées) car un encombrement aussi important (près de la moitié) du répertoire immunologique au profit d'un seul virus pourrait nuire à la diversité du répertoire et compromettre les défenses dirigées contre d'autres agents pathogènes, les réponses anti-tumorales ou encore vaccinales. Cependant cette hypothèse est à l'heure actuelle controversée (Sansoni et al., 2014). Par exemple, chez des individus jeunes et chez la jeune souris, le CMV pourrait augmenter les réponses immunologiques contre des antigènes différents de ceux du HCMV (Pera et al., 2014; Yager et al., 2009). A l'inverse, chez les personnes âgées, différentes études suggèrent que la séropositivité pour le HCMV est liée à des dysfonctionnements dans les réponses immunitaires (immunosénescence) et est associée à des pathologies incluant des maladies cardiovasculaires, athérosclérose, mais aussi des cancers et une augmentation de la mortalité (Sansoni et al., 2014). Ces observations suggèrent que le HCMV a un effet sur le système immunitaire qui dépend de l'âge de l'individu concerné. De plus, le HCMV peut influencer les réponses vaccinales contre d'autres agents pathogènes. Une récente étude menée par Furman et ses collaborateurs, montre que le CMV influence les réponses vaccinales contre le virus Influenza (virus de la grippe) et que cet effet est dépendant de l'âge de l'individu. En effet, ils ont observé que les jeunes individus séropositifs pour le HCMV ont une réponse anticorps et des T CD8+ augmentées suite à la vaccination contre le virus influenza alors que, chez les personnes âgées séropositives, cette réponse est diminuée. De plus, ils ont aussi montré que les jeunes souris infectées par le HCMV sont davantage protégées contre le virus influenza comparées aux souris non infectées et cette protection diminue avec l'âge de l'animal (Furman et al., 2015).

Par conséquent, le HCMV semble jouer un rôle dans l'immunosénescence chez l'Homme mais ceci reste controversé à l'heure actuelle.

F. Biologie du HCMV

1. Structure

La structure du HCMV est semblable à celles des autres Herpesvirus : Ce sont des virus à ADN double brin encapsulés dans une capsidie icosaédrique (*proteinaceous capsid*) elle-même entourée d'une matrice composée de protéines virales du tégment. L'ensemble est enveloppé d'une double couche lipidique contenant des glycoprotéines virales (**Figure 17**). Cependant, le HCMV a pour particularité d'avoir une taille importante de 200 à 300nm, c'est le génome le plus long des Herpesvirus.

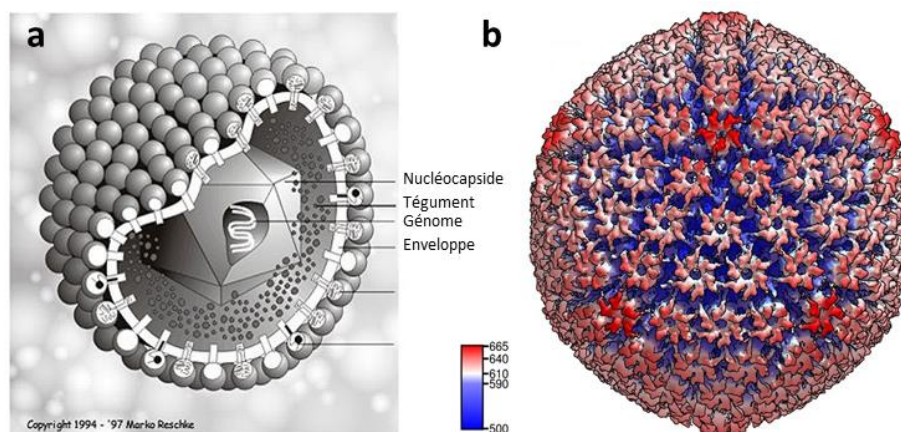


Figure 17 : Le HCMV (a) Modèle virtuel en 3D de la structure du HCMV. Modifié de (Gandhi and Khanna, 2004). (b) reconstitution 3D en cryo microscopie électronique de la capsidie du HCMV. Modifié de (Dai et al., 2013) .

a) Le génome viral

Le génome du HCMV mesure environ 235kb contenant environ 200 gènes, dont certains codent pour des ARNs non codants, incluant environ 14 microARNs. Par convention, les gènes sont nommés par leur position dans le génome. Le génome du HCMV a une architecture caractéristique des herpesvirus de classe E. Il est constitué de 2 régions uniques : une région longue unique (UL) et une région courte unique (US). Ces 2 régions sont flanquées par des paires de séquences répétées internes et externes : TRL (terminal repeat long) et IRL (internal repeat long) entourent la région UL tandis que TRS (terminal repeat short) et IRS (internal repeat short) entourent la région US. Le génome existe sous 4 formes isomériques générées par inversion des régions UL et US (Sijmons et al., 2014). Le génome possède plus de 200 cadres de lecture ouverts (Mocarski et al., 2007c)

b) La capside

La capside a une structure icosaédrique comprenant 12 pentons, 150 hexons, et 320 triplexes. Elle est composée d'au moins 5 protéines : *Major capsid protein* (MCP) codée par UL86, *Smallest capsid protein* (SCP) codée par UL48-49, *Minor capsid protein* codée par UL85, *minor capsid binding protein* codé par UL46, et des protéines d'assemblages codées par des fragments d'UL80. La MCP est la protéine la plus abondante (960 copies) de la capside et forme les pentons et hexons de cette dernière, tandis que la *Minor capsid protein* et *minor capsid binding protein* forme les triplexes qui sont localisés entre les pentons et hexons. La SCP quant à elle, a été démontrée comme « décorant » les hexons et ayant un rôle essentiel dans l'assemblage des virions, probablement par une interaction avec des protéines du tégument (Britt and Boppana, 2004).

c) Le tégument

Le tégument est la partie intermédiaire entre la capside et l'enveloppe. Celui-ci est formé par l'addition séquentielle de protéines d'abord dans le noyau puis dans le cytoplasme des cellules infectées. Le tégument est un compartiment qui contient la majorité des protéines virales. Approximativement 38 protéines virales tégumentaires différentes sont relarguées à l'intérieur de la cellule infectée durant l'infection. Cependant, ce compartiment contient aussi des protéines cellulaires et des ARN cellulaires dont le rôle est peu connu à ce jour. La majorité des protéines virales tégumentaires a pour particularité d'être phosphorylées et immunogènes. La protéine la plus abondante est pp65 codée par le gène UL83, suivi par pp71 et pp150 (Smith et al., 2014). Les protéines du tégument peuvent être classées en deux catégories : une partie de ces protéines joue un rôle structural et est importante dans l'assemblage et le désassemblage du virion, l'autre partie de ces protéines a un rôle dans la régulation de la réponse immune et de la réplication virale (Crough and Khanna, 2009; Tomtishen, 2012).

d) L'enveloppe virale

L'enveloppe du HCMV est composée d'une bicouche lipidique d'origine cellulaire (RE/Golgi) ainsi que de glycoprotéines virales telles que gB, gH, gL, gM et gN. La majorité d'entre elles (gB, gH, gM, gN) ont été décrites comme étant essentielles à la production de virions infectieux (Hobom et al., 2000). De plus, ces glycoprotéines jouent un rôle important dans l'entrée du virus dans la cellule hôte et dans sa transmission de cellule à cellule (Navarro et al., 1993). Par exemple, il a été démontré que la glycoprotéine gB peut interagir avec le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) ou avec des intégrines pour favoriser l'entrée du virus dans la cellule (Compton, 2004). Ainsi l'attachement et l'entrée du virus dans la cellule cible peuvent être inhibés par l'utilisation d'anticorps neutralisants spécifiques de gH/gL (Fouts et al., 2012).

2. Cycle viral : Réplication et assemblage

Avant l'entrée dans la cellule, le virus doit s'attacher à la membrane. La capacité du HCMV à pouvoir infecter différents types cellulaires suggère qu'il utilise différents récepteurs présents à la surface des cellules. Il a été décrit que les glycoprotéines virales gB ou gM/gN peuvent se lier aux proteoglycanes à héparane sulfate (HSPG) présents sur la majorité des cellules (Compton et al., 1993). Cependant cette interaction est nécessaire mais pas suffisante pour induire l'entrée du virus. Ainsi, le récepteur EGFR présent sur un grand nombre de types cellulaires permissifs pour HCMV tels que les fibroblastes semble être un récepteur important via sa liaison avec gB du HCMV (Compton, 2004). EGFR n'est pas exprimé sur les cellules hématopoïétiques ce qui suggère qu'un autre récepteur est utilisé pour l'entrée du virus dans ces cellules, tel que DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) pour les cellules dendritiques (Halary et al., 2002). Une fois l'attachement réalisé, le mécanisme d'entrée varie selon le type cellulaire. Le virus peut entrer soit par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique cellulaire, ce qui concerne la majorité des cellules permissives, soit par endocytose (cellules endothéliales) (**Figure 18**). La capside et les protéines du tégument sont alors libérées dans le cytoplasme de la cellule infectée. La nucléocapside est transportée le long des microtubules jusqu'au noyau, lieu où l'ADN viral est libéré.

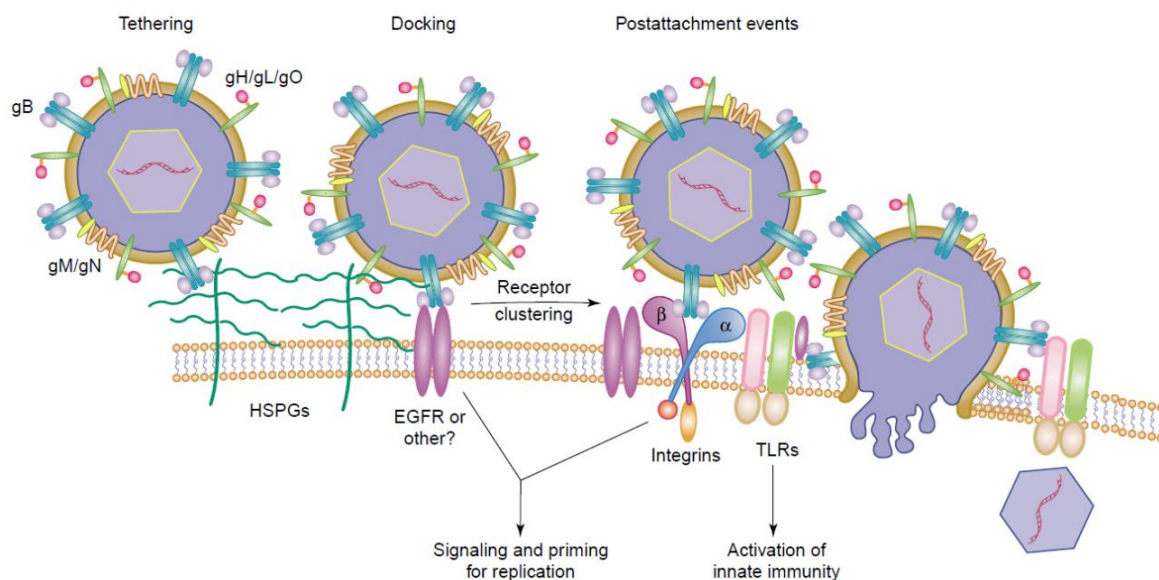


Figure 18 : Mécanisme d'entrée du HCMV par fusion membranaire. Les glycoprotéines gB ou gM/gN se lient aux HSPG, puis gB interagit avec l'EGFR. Des interactions entre les glycoprotéines du HCMV et des intégrines ainsi que des TLR ont aussi lieu, entraînant un rapprochement puis la fusion des membranes cellulaires et virales. La nucléocapside est alors libérée dans le cytoplasme (Compton, 2004).

Les cellules différenciées telles que les fibroblastes, neurones, astrocytes, cellules épithéliales, stromales sont permissives pour le HCMV. Dans ce cas, le virus pénètre dans la cellule et entame un cycle réplcatif dont l'expression des gènes viraux est régulée dans le temps en 3 phases distinctes :

- Phase très précoce (IE, Immediate Early)

C'est durant cette phase que vont être produites les protéines régulant les transcriptions ultérieures. Les transcrits très précoces (IE) sont produits entre 1 et 4h après l'infection. Cette transcription est notamment régulée par le promoteur *Major Immediate Early Promotor* (MIEP) qui permet l'expression des protéines IE-1 et IE-2, protéines IE principales et les mieux caractérisées à ce jour. IE-1 et IE-2 jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes viraux précoces et tardifs.

- Phase précoce (E, Early)

Durant cette phase, les protéines responsables de la réplication de l'ADN viral double brin sont produites telles que l'ADN-polymérase virale codée par le gène UL54 qui est associée à la protéine UL44 pour former le complexe de réplication, ainsi que les protéines UL34a et b (Yu et al., 2003).

- Phase tardive (L, Late)

Les protéines tardives sont des composantes structurales du virion qui permettent l'assemblage de la capside, l'encapsidation de l'ADN et la sortie des nouveaux virions hors de la cellule. En effet, durant cette phase vont être produites notamment les glycoprotéines d'enveloppe, les protéines majeures et mineures de la capside.

Une fois l'ADN viral répliqué et les protéines tégmentaires enfermées dans la capside, cette dernière migre du noyau vers le cytoplasme en s'enveloppant de la membrane interne nucléaire qui forme alors sa première enveloppe. Le virion va récupérer une deuxième enveloppe provenant du compartiment intermédiaire entre RE-Golgi. Les nouveaux virions formés sont relargués hors de la cellule par exocytose à la membrane plasmique entraînant la lyse des cellules (**Figure 19**). Il peut également y avoir production de « corps denses » qui sont des particules virales défectives car elles ne contiennent quasiment que des protéines tégmentaires (absence de génome). Ces corps denses sont très fortement immunogènes car les protéines tégmentaires font partie des antigènes du HCMV reconnus par les lymphocytes T et B (voir partie II. B. 2.).

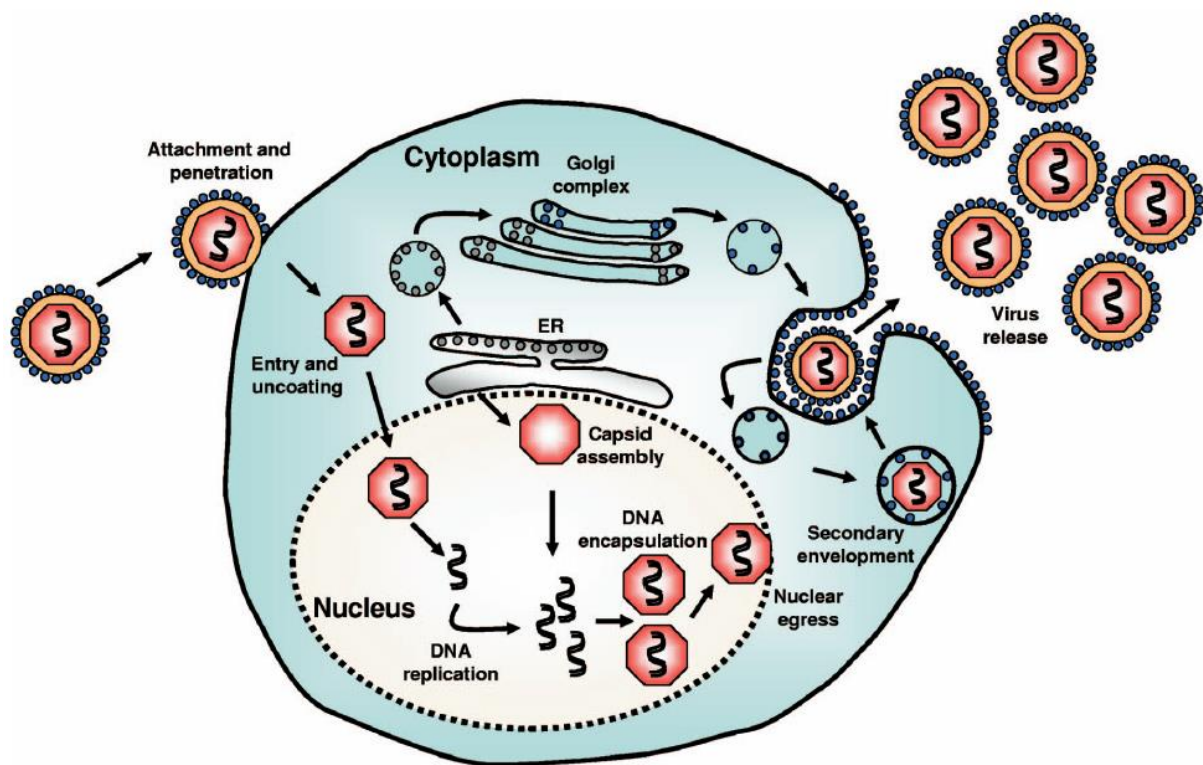


Figure 19 : Cycle viral lytique du HCMV

Le virus entre dans la cellule soit par fusion soit par endocytose. Une fois la nucléocapside libérée dans le cytoplasme, celle-ci est amenée jusqu'au noyau. L'ADN viral est alors répliqué puis encapsulé et transporté dans le cytoplasme. Enfin, la capsid est enveloppée par la membrane nucléaire puis par celle du RE. Les nouveaux virions sont ensuite libérés de la cellule par exocytose (Crough and Khanna, 2009).

3. Infection latente et réactivation

Le HCMV a pour particularité de persister, sous forme latente, tout au long de la vie de l'individu. Les premières évidences de la latence proviennent de l'observation que le virus ne pouvait pas être isolé dans le sang de donneurs d'organes mais que la transfusion de sang permettait le transfert de l'infection au receveur (Jordan, 1983).

Les cellules dans lesquelles est retrouvé du virus latent sont les cellules souches hématopoïétiques CD34+, les monocytes, les cellules endothéliales et les progéniteurs de DC myéloïdes (Reeves et al., 2005b). Dans ce cas, le virus s'attache à la membrane plasmique et pénètre dans la cellule mais le cycle réplcatif est rapidement interrompu : il n'y a pas d'expression des gènes précoces et tardifs. L'ADN viral forme alors un épisode et l'expression de ses gènes se limite à quelques transcrits spécifiques de latence (Latency Associated Protein). L'expression des gènes très précoces IE peut être retrouvée *in vitro* lors d'infection latente de façon transitoire au début de l'infection. La protéine LUNA est présente lors d'une

infection latente : son niveau d'expression diminue lorsque le niveau d'expression des gènes très précoces augmente, mais sa fonction n'est pas décrite (Reeves and Sinclair, 2010). CMV-IL10 codé par le gène UL111a est aussi produit lors d'une infection latente. Cette cytokine virale est importante pour entretenir la persistance virale notamment en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires (Avdic et al., 2011). D'autres protéines produites sont importantes pour le maintien de la latence comme pUL138. En effet, la séquence UL138 est nécessaire pour maintenir une infection latente dans des cellules CD34+ *in vitro* (Goodrum et al., 2007). La latence du HCMV reste un domaine mal connu à ce jour et le rôle de certains transcrits de latence reste à éclaircir (Goodrum et al., 2012).

Le modèle le plus utilisé pour étudier la latence, est l'infection de cellules souches CD34+ *in vitro* par des souches cliniques de HCMV. Plus rarement, les monocytes ont aussi été utilisés pour étudier la latence *in vitro*.

La latence est principalement due à un contrôle de l'expression des gènes du HCMV, en particulier des gènes sous le contrôle du MIEP (Reeves and Sinclair, 2013). Lors de la latence, le MIEP est associé à des facteurs qui répriment la transcription des gènes sous son contrôle. Ces facteurs sont généralement des enzymes associées à la méthylation ou déacétylation des gènes, réprimant leur transcription. Ceci entraîne entre autre la répression des gènes IE dont l'expression est importante pour réguler les transcriptions ultérieures (précoces et tardives). Cette répression d'IE entraîne donc un arrêt du cycle réplcatif (**Figure 20**).

Le virus se réactive périodiquement, ce qui conduit à des épisodes d'excrétion intermittente de virus dans les sécrétions respiratoires, l'urine, le sperme, les sécrétions cervicales. En effet, le virus peut se réactiver suite à certains stimuli, comme la différenciation cellulaire des monocytes ou des cellules souches CD34+ en cellules dendritiques et macrophages *ex vivo* (Reeves et al., 2005b). La réactivation virale lors de la différenciation peut s'expliquer par le fait que des facteurs impliqués dans l'acétylation (histone acétyl transférases) sont associés à des états de différenciation cellulaire (Reeves et al., 2005a; Sinclair, 2008). Les facteurs impliqués dans cette réactivation sont à l'heure actuelle mal connus mais il semblerait que le TNF- α joue un rôle clé dans ce phénomène (Goodrum et al., 2012). En effet, le TNF- α en se liant sur son récepteur sur les cellules infectées favorise l'activation de la protéine kinase C et de NF- κ B qui va déclencher la transcription des gènes très précoces IE, eux-mêmes entraînant la suite du cycle réplcatif décrit précédemment (Crough and Khanna, 2009; Stein et al., 1993). Il a été montré récemment qu'un corépresseur KAP1/TRIM28 (Krüppel-associated box associated protein 1) est impliqué dans la répression d'expression de gènes durant la latence. A l'inverse, durant une infection lytique, l'activité de KAP1 est inhibée par la phosphorylation induite par mTOR (Rauwel et al., 2015).

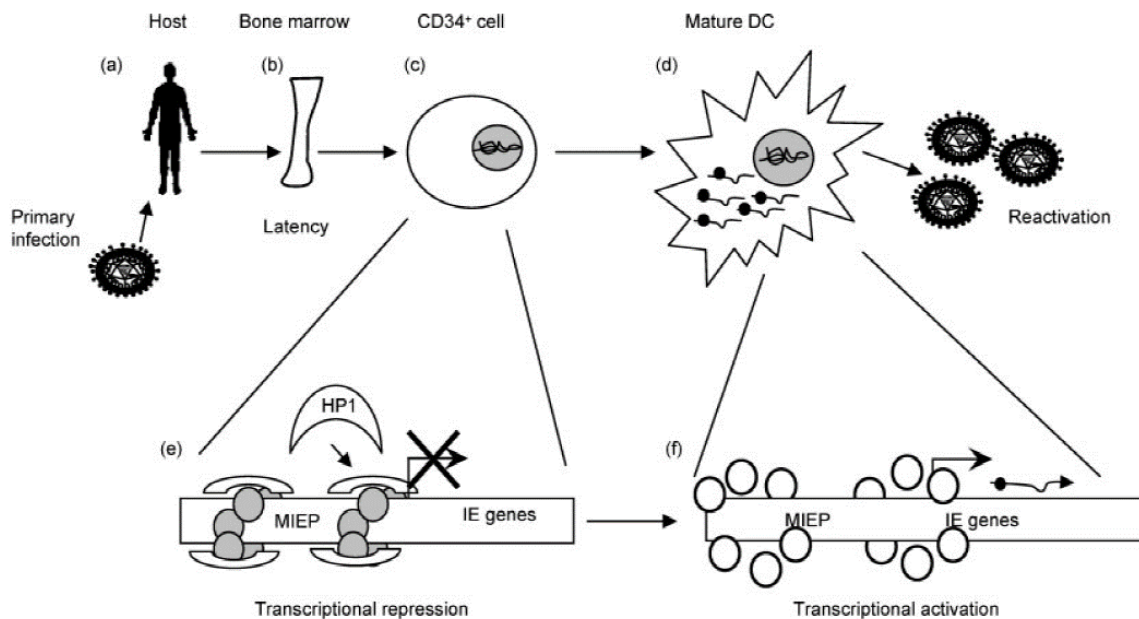


Figure 20 : Régulation de la réactivation et de la latence par des mécanismes épigénétiques. Suite à la primo-infection (a), le HCMV établit une infection latente dans les précurseurs hématopoïétiques CD34+ (b). Le génome viral persiste dans ces cellules (c), en absence d'expression de gènes viraux lytiques due à l'action des répresseurs transcriptionnels cellulaires (dont KAP1 et HP1) liés au promoteur MIEP. Ces répresseurs recrutent des enzymes qui induisent la modification des histones liées au MIEP ce qui a pour conséquence une répression de la transcription des gènes IE (e). Cependant, si les cellules CD34+ se différencient en CD, une réactivation de l'expression des gènes lytiques a lieu, ayant pour résultat une libération de nouveaux virions infectieux (d). Cette réactivation est concomitante avec un remodelage de la chromatine du MIEP ce qui a pour conséquence une activation de la transcription des gènes IE (f). (Sinclair and Sissons, 2006)

4. Les différentes souches virales HCMV

Afin de les amplifier, les différentes souches HCMV utilisées en laboratoire ont subi de nombreux passages sur des fibroblastes *in vitro*. Ces passages excessifs ont entraîné des modifications dans le génome viral qui sont associées à de nombreux changements phénotypiques de ces variants (Wilkinson et al., 2015). Une des modifications les plus importantes concerne le tropisme de ces souches. En effet, généralement les souches issues d'isolats cliniques (Toledo, VHL/E) ayant subi peu de passages peuvent infecter efficacement les cellules endothéliales, épithéliales et les cellules myéloïdes. Les souches dites « de laboratoire » (AD169, Towne) ayant subi de nombreux passages ont perdu leur tropisme pour ces cellules et ne peuvent pas s'y répliquer. Ainsi il a été démontré que la souche AD169 a perdu une séquence d'environ 13kb, nommée région UL/b' contenant les séquences UL133 à UL150. Cette région UL/b' code notamment pour vCXC-1 (un homologue d'IL-8) et UL144, un membre de la famille des récepteurs du TNF (Prichard et al., 2001). De plus, d'autres gènes ont subi des mutations dues aux nombreux passages. Il a été mis en évidence qu'une mutation située dans la séquence UL131 est à l'origine de la perte de tropisme pour les cellules

endothéliales et des mutations situées entre UL128 et 131 à la perte de tropisme pour les cellules épithéliales (Ryckman et al., 2008; Wang and Shenk, 2005). Ces souches auraient à l'inverse acquis des répétitions excessives dans la région interne. L'hypothèse serait que ces répétitions sont apparues suite à la duplication des séquences à partir du bord gauche du composant UL pour compenser la perte de séquences (Prichard et al., 2001).

II. Réponses immunitaires anti-HCMV

Le HCMV est généralement asymptomatique chez un individu sain, principalement grâce à une réponse efficace du système immunitaire. Ainsi l'immunité innée et adaptative joue un rôle clé dans le contrôle des infections par ce virus (**Figure 23**). Ces réponses immunitaires permettent d'inhiber la réplication virale efficacement lors d'une primo-infection ainsi que lors d'épisodes de réactivation virale.

Etant donné que le HCMV a une spécificité d'hôte restreinte à l'Homme, l'étude du rôle du système immunitaire dans le contrôle des infections par le CMV a été largement étudiée à partir de modèle de souris utilisant du CMV murin (MCMV). Des études ont aussi été réalisées à partir de rats, cochons d'inde et macaques. Les différentes souches de CMV utilisées dans ces études n'ont pas une homologie parfaite avec les souches de HCMV. Par exemple, les souches de MCMV ont 50% des ORF (Open Reading Frame) homologues avec les souches de HCMV. Ainsi, les résultats expérimentaux obtenus avec les souches MCMV ne sont pas tous transposables à l'Homme. Cependant, les mécanismes de stimulation du système immunitaire par le CMV sont en grande partie conservés en utilisant ces modèles animaux (Loewendorf and Benedict, 2010). Par conséquent, je vous détaillerai les études utilisant d'une part les modèles animaux et, d'une autre part, les études cliniques chez l'Homme.

A. Immunité innée

L'immunité innée est la première réponse immunitaire mise en jeu lors d'une infection. Cette réponse se met en place en seulement quelques heures. Elle permet l'élimination du pathogène grâce à l'intervention de cellules de l'immunité innée présentes localement. Elle permet aussi le déclenchement de l'immunité adaptative en menant à l'activation des différentes populations de lymphocytes. Il a été démontré un rôle clé de l'immunité innée dans le contrôle de l'infection par le CMV.

1. Reconnaissance du CMV via les PRR

La reconnaissance de pathogènes par les cellules de l'immunité innée implique des récepteurs appartenant à la famille des PRR : les TLR. Même si la majorité des études sur les PRR mettent en évidence la détection de bactéries, de nombreuses études plus récentes montrent une reconnaissance d'agents infectieux viraux. Ainsi il a été mis en évidence que le CMV peut être reconnu par des TLR-2, 3 et 9 (**Figure 21**). Cette stimulation des TLR par le CMV induit une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires à l'origine du recrutement de cellules de l'immunité innée ainsi qu'une sécrétion d'IFN de type I qui sont des éléments clés dans les réponses antivirales (Boehme and Compton, 2004). Les TLR-3 et 9 présents dans les endosomes sont capables de reconnaître respectivement l'ARN viral double brin et les motifs CpG contenus dans l'ADN. En effet, des souris homozygotes pour une mutation sur le TLR-9 ou Knock-out pour le TLR-3 sont plus susceptibles à l'infection par le MCMV et présentent une diminution de la sécrétion d'IFN de type I et de l'activation de cellules NK (Tabeta et al., 2004). De plus, la stimulation de TLR-9 par le MCMV est importante pour le contrôle de l'infection par MCMV *in vitro* et *in vivo* (Delale et al., 2005; Hokeness-Antonelli et al., 2007). Le HCMV est également capable d'interagir avec le TLR-2 via ses glycoprotéines d'enveloppes gB/gH menant à une activation de NF- κ B suivi d'une sécrétion de cytokines inflammatoires dans des fibroblastes infectés (Boehme et al., 2006).

La reconnaissance du CMV par les PRR peut aussi avoir un effet indirect sur le système immunitaire. En effet, les monocytes, macrophages et cellules dendritiques sont des cellules qui expriment des PRR et qui peuvent être infectées par le HCMV. Suite à l'infection et à la stimulation de leur PRR, ces cellules produisent des cytokines pro-inflammatoires et présentent les antigènes HCMV aux lymphocytes T, acteurs majeur dans l'immunité anti-HCMV.

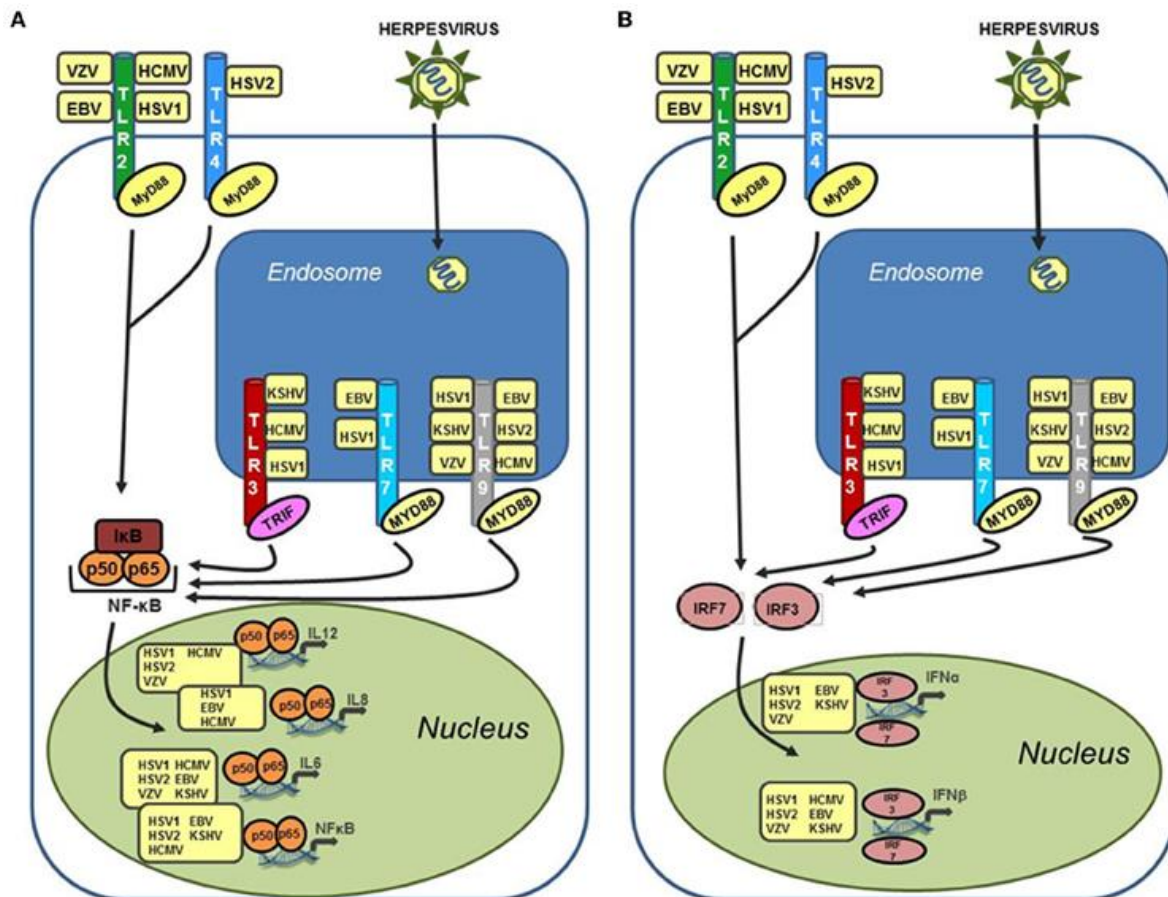


Figure 21 : L'activation des TLR par les herpesvirus

Le HCMV peut être reconnu à la membrane cellulaire par le TLR-2 via ses glycoprotéines d'enveloppe gB/gH. Il est également reconnu dans les endosomes par les TLR-3 et 9 via son ARN et ADN viral. Ces stimulations des TLR par le HCMV mènent à l'activation de la voie NF-κB à l'origine de la transcription de cytokines pro-inflammatoires (a) et l'activation de la voie IRF7/3 menant à la sécrétion d'IFN de type I (b). (West et al., 2012).

2. Les cellules NK

L'activation des cellules NK est sous le contrôle d'une balance de signaux médiés par des récepteurs activateurs ou inhibiteurs. Une fois activées, ces cellules peuvent sécréter des cytokines telles que l'IFN-γ et le TNF et avoir une activité cytotoxique.

Depuis de nombreuses années, le rôle des cellules NK lors d'infection par le CMV a beaucoup été étudié chez la souris en utilisant la souche MCMV. Les premières expériences dans les années 80 démontraient que des souris déplétées en cellules NK et infectées par le MCMV ont un titre viral plus élevé dans le foie et la rate (Bukowski et al., 1983). Ceci suggère que les cellules NK participent au contrôle de la réplication virale. De plus, il a aussi été démontré que le transfert adoptif de cellules NK dans des souris permet une protection contre l'infection par le MCMV (Bukowski et al., 1985). Plus récemment, il a été mis en évidence que

la reconnaissance des cellules infectées par les cellules NK implique l'immunorécepteur Ly49H, récepteur absent chez l'Homme (Brown et al., 2001). A l'heure actuelle, il semble clair que le CMV peut être contrôlé par les cellules NK via des récepteurs activateurs, mais la contribution exacte des différents signaux reste floue (Carrillo-Bustamante et al., 2014).

Chez l'Homme, le rôle des NK lors d'infection par HCMV est peu décrit dans la littérature. En 1989, il a été décrit un cas unique d'un adolescent déficient en NK hautement susceptible aux infections par les herpesvirus dont le HCMV (Biron et al., 1989). De plus, l'activité des cellules NK est augmentée durant une infection par le HCMV chez des patients transplantés de reins suggérant une implication de ceux-ci dans l'élimination du virus (Venema et al., 1994). Chez les patients transplantés avec des cellules souches hématopoïétiques, les cellules NK sont les premiers lymphocytes restaurés et cette restauration est corrélée avec une « guérison » de l'infection par le HCMV (Quinnan et al., 1982). Chez ces patients, l'infection ou la réactivation du HCMV induit une accélération de la maturation et la différenciation des cellules NK caractérisées par un phénotype KIR+ NKG2A- et NKG2C+, et décrites comme ayant un rôle protecteur contre l'infection par le HCMV (Della Chiesa et al., 2013; Foley et al., 2012). Cependant le rôle précis de cette population dans le contrôle de l'infection reste à déterminer (Muntasell et al., 2013).

De nombreuses études *in vitro* ont été réalisées afin de mettre en évidence l'activité des cellules NK humaines ainsi que les récepteurs mis en jeu. Ainsi, il apparaît clairement qu'en fonction du type cellulaire de la cellule cible et de la souche virale utilisée, les cellules NK n'ont pas toujours la même activité et les récepteurs mis en jeu sont variables. Des études utilisant des cellules NK humaines démontrent que ces derniers peuvent inhiber la réplication virale dans des fibroblastes infectés en stimulant la sécrétion d'IFN- β par ces derniers (Iversen et al., 2005). Dans ce cas, les cellules NK sont capables de produire de l'IFN- γ et du TNF, participant ainsi au contrôle de la réplication virale et au recrutement et à l'activation des effecteurs de l'immunité innée et adaptative. Au niveau du mécanisme d'activation des cellules NK, alors que le récepteur principal mis en jeu dans l'élimination des fibroblastes infectés est le NKG2D, la reconnaissance et la lyse des cellules dendritiques infectées impliquent les récepteurs NKp46 et DNAM-1 (Magri et al., 2011). De plus, il a récemment été mis en évidence une implication des cellules NK de la decidua placentaire dans le contrôle des infections intra-utérines par le HCMV (Siewiera et al., 2013).

Cependant, les cellules infectées ne sont pas toujours sensibles à l'activité des cellules NK. Cerboni et ses collaborateurs, ont démontré que des fibroblastes infectés par des isolats cliniques de HCMV sont résistants à l'activité cytotoxique de cellules NK, tandis qu'il est observé un effet variable de cette cytotoxicité avec des souches de laboratoire tel qu'AD169 et Towne (Cerboni et al., 2000). Ces résultats sont notamment la conséquence d'une mise en

place de mécanismes d'échappement au système immunitaire par le HCMV. Nous verrons ces mécanismes dans le chapitre suivant.

3. Les lymphocytes T $\gamma\delta$

De nombreuses études ont mis en évidence un rôle important des lymphocytes T $\gamma\delta$ chez la souris lors d'une infection par le MCMV. Cependant, nous avons vu dans le Chapitre 1 (partie I. A. 2.) que les T $\gamma\delta$ comportent des populations qui ne sont pas homologues chez l'Homme et la souris. Par exemple, la population des T $\gamma\delta$ humains majoritaire dans le sang, les T V γ 9V δ 2 n'ont pas d'équivalent chez la souris. Par conséquent, les résultats obtenus chez la souris ne peuvent pas être directement transposables à l'Homme, en ce qui concerne ces populations de T $\gamma\delta$.

Après infection par le MCMV, les T $\gamma\delta$, parmi d'autres cellules de l'immunité innée, sont recrutés sur le site infectieux dans les glandes salivaires sous-maxillaires (Cavanaugh et al., 2003). Il a été mis en évidence qu'une population de T $\gamma\delta$, les T V γ 1+ participent à la réponse immunitaire rapidement mise en place suite à l'infection, notamment grâce à la production d'IFN- γ induite par la reconnaissance d'une protéine de choc thermique (HSP65) dont l'expression est augmentée suite à l'infection par le MCMV (Ninomiya et al., 2000). De plus, la déplétion de ces cellules est corrélée à une augmentation du titre viral dans le foie (Ninomiya et al., 2000). Etant donné que l'infection par le CMV touche particulièrement les individus immunodéprimés, deux études récentes ont été menées pour approfondir les connaissances sur le rôle de ces T $\gamma\delta$ dans un contexte d'immunosuppression. Ainsi ces études ont porté sur l'implication des T $\gamma\delta$ dans l'immunité anti-MCMV chez des souris déficientes en lymphocytes T et B. Winkler et ses collaborateurs, ont montré que des souris n'ayant ni lymphocytes B, ni T CD8+ et ni T CD4+ (JHT CD8 $^{-/-}$ et déplétées en T CD4+) sont capables de contrôler l'infection par le MCMV (Sell et al., 2015). Les T $\gamma\delta$ isolés des souris infectées sont capables de lyser des cellules infectées par le MCMV *in vitro* et ces mêmes cellules, une fois transférées dans des souris RAG $^{-/-}$ (absence de lymphocytes T et B) leur confèrent une protection contre le virus. Une expansion de T V γ 1+ et V γ 2+ est observée dans les organes où le MCMV est persistant. Dechanet-Merville et ses collaborateurs ont montré que les T $\gamma\delta$ sont aussi compétents que les T $\alpha\beta$ conventionnels pour protéger les souris contre le MCMV en limitant la réplication virale, les dommages associés à l'infection et la mort induite par ce virus (Khairallah et al., 2015). Dans des souris TCR $\alpha^{-/-}$, cette réponse serait médiée par des T V γ 1+ et V γ 4+ ayant un phénotype effecteur/mémoire (CD44+ CD62L-). Ainsi, ces études ont permis de démontrer un potentiel antiviral des T $\gamma\delta$ dans un contexte d'immunosuppression en lymphocytes T et B chez la souris.

Chez l'Homme, dès la fin des années 90, l'implication de populations T $\gamma\delta$ lors d'une infection par le HCMV a été mise en évidence. Les T $\gamma\delta$ ont d'abord été étudiés chez des patients immunodéprimés suite à une transplantation de rein. Il a été observé une expansion de ceux-ci associée à une infection par HCMV (Dechanet et al., 1999a; Fornara et al., 2011). Cette expansion concerne les sous-populations T V δ 1+ et V δ 3+ qui sont capables de proliférer *in vitro* en présence de lysat de cellules infectées et auraient un rôle dans la réponse immune anti-HCMV chez les patients transplantés (Dechanet et al., 1999b). Cette expansion a été suivie durant 10 mois après la transplantation. Ainsi, il a été démontré que les patients avec une expansion tardive de T $\gamma\delta$ (après 45 jours) ont un niveau de virémie plus élevée et des maladies associées aux infections HCMV plus grave que les patients ayant une expansion de T $\gamma\delta$ plus précoce (Lafarge et al., 2001). De plus, cette expansion, concernant seulement les T V δ 2neg, est associée à une résolution de l'infection HCMV chez les patients. Une prolifération des T V δ 2neg a aussi été observée suite à une réactivation virale chez des patients transplantés de cellules souches hématopoïétiques ainsi que chez des individus immunocompétents (Knight et al., 2010; Pitard et al., 2008) avec une fréquence qui augmente avec l'âge de l'individu (Alejef et al., 2014). Enfin, *In utero*, dans le cas d'infection congénitale HCMV, on retrouve une expansion des T V δ 2neg fœtaux produisant de l'IFN- γ (Vermijlen et al., 2010).

De façon similaire aux lymphocytes T CD8+ spécifiques du HCMV, le phénotype des T V δ 2neg ont un phénotype de type effecteur/mémoire (CD45RA+ CD27-) considéré comme étant une « signature » d'une infection HCMV antérieure (Couzi et al., 2015). Ces T V δ 2neg produisent de l'IFN- γ et du TNF, ont une activité cytotoxique contre des fibroblastes infectés *in vitro* et peuvent limiter la réplication virale (Halary et al., 2005). Les T V δ 2neg sont cytotoxiques *in vitro* contre les cellules infectées par la production de perforine et granzyme B (Halary et al., 2005; Vermijlen et al., 2010).

Les mécanismes d'activation des T V δ 2neg dans un contexte d'infection par HCMV sont longtemps restés inconnus. L'utilisation d'anticorps bloquants du TCR $\gamma\delta$ démontre que la stimulation de celui-ci est nécessaire à l'activation de ces cellules. Récemment, il a été mis en évidence que les T V δ 2neg (V γ 4V δ 5) reconnaissent via leur TCR une protéine transmembranaire de type 1 homologue des molécules de CMH-I, le récepteur EPCR (endothelial protein C receptor) (Willcox et al., 2012) (**Figure 22**). Cependant, les T V δ 2neg capables de reconnaître les cellules infectées par HCMV ne reconnaissent pas tous la molécule EPCR, indiquant l'existence d'autres ligands du TCR $\gamma\delta$ (Couzi et al., 2015). De plus, il a été démontré que ces cellules activées expriment le récepteur CD16. L'infection favorise

une expansion de T V δ 2neg CD16+ circulants dont le nombre double (Couzi et al., 2015). Ce récepteur peut lier les Ig anti-HCMV et après une interaction avec l'antigène, ces cellules inhibent la réplication virale en particulier en stimulant la production de cytokines telles que l'IFN- γ et le TNF (Couzi et al., 2012) (**Figure 22**). Deux autres molécules peuvent participer à la co-stimulation des T V δ 2neg : CD8 α qui agit comme corécepteur avec les TCR $\gamma\delta$ et LFA-1 qui reconnaît la molécule ICAM-1 dont l'expression augmente sur les cellules infectées par CMV (Scheper et al., 2013; Willcox et al., 2012). Les récepteurs NKG2 ne semblent pas être impliqués dans l'activation de ces lymphocytes malgré que l'expression de certains de leurs ligands augmente sur les cellules infectées tels que les molécules MICA/B et ULBP1-6 (Halary et al., 2005).

Les T V δ 2neg spécifiques du HCMV ont aussi un effet indirect dans l'immunité anti-tumorale. *In vitro*, ces T V δ 2neg sont capables de tuer les cellules tumorales aussi efficacement que les cellules infectées par le HCMV (**Figure 22**). De plus, il a été observé chez des souris immunodéficientes ayant des xenogreffes de tumeurs humaines, que les T V δ 2neg spécifiques du HCMV sont capables d'inhiber le développement de la tumeur (Devaud et al., 2013). Chez les patients transplantés, l'expansion de cette population lymphocytaire est corrélée avec une diminution de l'apparition de cancer les années suivantes (Couzi et al., 2010).

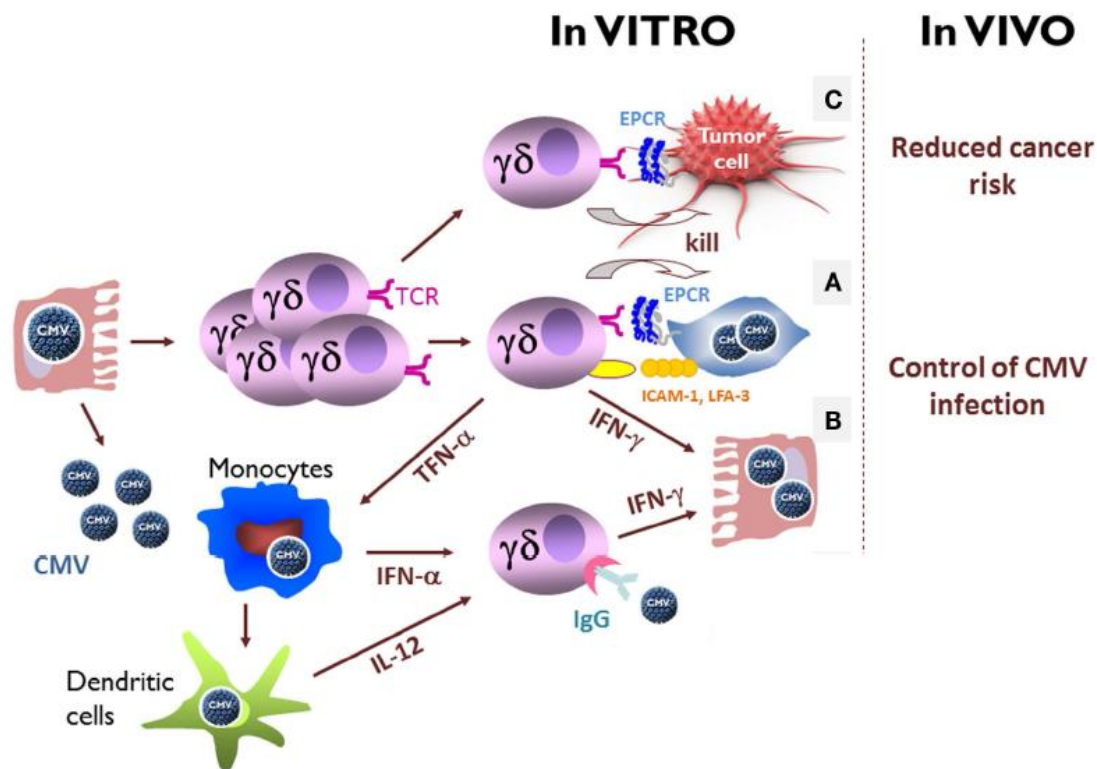


Figure 22 : Effets directs et indirects des T V δ 2neg induit lors d'une infection par HCMV, *in vivo* et *in vitro* : (A) *In vitro*, les T V δ 2neg reconnaissent les molécules EPCR sur les cellules infectées via leur TCR ainsi qu'ICAM-1 et LFA-3 exprimés sur les cellules cibles. En réponse les T V δ 2neg produisent du TNF et de l'IFN- γ et lysent les cellules infectées. (B) En absence de stimulation TCR, les T V δ 2neg CD16+ produisent de l'IFN- γ et inhibent la réplication virale en réponse aux IgG-CMV, en présence d'IL-12 et d'IFN- α produites par des monocytes et des cellules dendritiques. (C) Ces T V δ 2neg induits lors d'une infection HCMV sont également capables de tuer des cellules tumorales (Couzi et al., 2015).

B. Immunité adaptative

Le HCMV est un agent très immunogène ce qui induit de fortes réponses immunitaires contre celui-ci. La réponse adaptative joue un rôle important dans le contrôle de l'infection par le HCMV. Cette réponse est médiée par les lymphocytes B mais aussi les lymphocytes TCD4+ et lymphocytes TCD8+ qui sont des acteurs importants de l'immunité anti-HCMV.

1. Réponses humorales

Plusieurs études démontrent un rôle important de la réponse humorale dans le contrôle de l'infection par le HCMV, notamment en limitant la dissémination du virus et la sévérité de la maladie. L'importance de la neutralisation du virus par des anticorps est soutenue par de nombreuses études utilisant différents types de modèles animaux ainsi que des études chez l'Homme.

Dans les années 90, les premières études utilisant des cochons d'inde démontrent un effet protecteur des Ig suite à une infection congénitale par CMV, en limitant la sévérité de la maladie par un contrôle de la dissémination virale. Ainsi, l'immunisation passive par des Ig spécifiques du CMV améliore la survie des animaux mais cependant ne permet pas de la prévenir (Bratcher et al., 1995; Harrison et al., 1995). Quelques années plus tard, une immunisation active à partir de protéines gB recombinantes sur des cochons d'inde a permis de protéger contre l'infection fœtale et limiter la sévérité de la maladie liée au CMV (Schleiss et al., 2004).

Après primo-infection chez l'Homme, des Ig spécifiques d'un grand nombre de protéines de HCMV sont détectables dans le sérum. Ces Ig sont spécifiques de protéines du tégument telles que pp65 ou pp150, de glycoprotéines d'enveloppe comme gB ou gH mais aussi de protéines non structurales telles que la protéine IE1 (Hanley and Bollard, 2014). La plupart des patients séropositifs ont des Ig anti-gB dans le sérum et il est décrit que ceux-ci représentent, dans plus de 50% des cas, des Ig neutralisants. La réponse humorale a été particulièrement étudiée lors de la grossesse. En effet, il a été mis en évidence que les Ig anti-HCMV présentes chez les femmes séropositives avant une grossesse jouent un rôle important pour limiter la transmission du virus au fœtus et protéger le nouveau-né de complications associées aux infections par le HCMV (Fowler et al., 1992). Ainsi, l'utilisation d'une immunisation passive avec des Ig anti-HCMV chez la femme enceinte permet de limiter la réplication virale au niveau du placenta et réduire les complications associées aux HCMV (Maidji et al., 2010).

Le rôle des Ig anti-HCMV a aussi été étudié chez les patients immunodéprimés transplantés. Des effets bénéfiques ont été observés sur la primo-infection ou la réactivation chez des patients transplantés de reins (Snydman et al., 1987) mais les effets sont moins clairs concernant les patients transplantés de cellules souches hématopoïétiques.

Les Ig anti-HCMV peuvent avoir un effet direct par neutralisation des particules virales mais aussi indirect en favorisant l'activation des cellules NK ou des lymphocytes $T\gamma\delta$ par l'intermédiaire de récepteur de la partie Fc des immunoglobulines (CD16) (Couzi et al., 2012).

2. Réponses cellulaires

La réponse médiée par les lymphocytes T est le mécanisme immunitaire principal par lequel la réplication du HCMV est contrôlée. En effet, la réponse immune déclenchée suite à la primo-infection ne permet pas d'éradiquer le virus mais les lymphocytes T CD4+ et T CD8+ sont importants dans le contrôle de la réplication virale suite à une réactivation.

a) Les lymphocytes T CD8⁺

Le rôle des T CD8⁺ lors d'une infection CMV a été, dans un premier temps, étudié chez la souris. Ainsi, la déplétion de T CD8⁺ chez la souris induit une augmentation de l'incidence de la réactivation virale du MCMV (Polic et al., 1998). De plus, le transfert adoptif de T CD8⁺ confère une protection face à la réplication et la dissémination du MCMV (Mutter et al., 1988).

L'implication des T CD8⁺ chez l'Homme dans l'immunité anti-HCMV a été démontrée depuis de nombreuses années. Les patients ayant subi une transplantation de moelle osseuse ont davantage de complications associées à l'infection HCMV lorsqu'ils n'ont pas de réponse T CD8⁺ spécifiques du HCMV détectable (Reusser et al., 1991). La présence de T CD8⁺ chez les patients transplantés de reins ou d'autres organes solides est aussi associée à une protection contre le HCMV, avec une diminution des complications associées (Reusser et al., 1999). Riddell et ses collaborateurs ont réalisé pour la première fois un transfert adoptif de clones TCD8⁺ spécifiques du HCMV chez des patients transplantés de moelle osseuse. Ils ont observé que le transfert a permis de reconstituer l'immunité cellulaire du HCMV et de favoriser une protection contre celui-ci en limitant la réactivation virale et les maladies associées (Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995).

Un grand nombre de protéines virales produites durant les différentes phases de la réplication sont reconnues par les T CD8⁺. Ainsi la réponse T CD8⁺ est diversifiée, avec une reconnaissance d'antigènes structuraux tels que les glycoprotéines d'enveloppe gB et gH, des protéines tégumentaires comme pp28, pp150, pp65, des protéines très précoces telles que IE1 et IE2 et des séquences US2, US3, US6, US11, UL16 et UL18 (Crough and Khanna, 2009). Les antigènes immunodominants dans la réponse T CD8⁺ anti-HCMV sont IE1 (UL123), IE2 (UL122) et pp65 (UL83). Grâce à l'utilisation de banques de peptides synthétiques couvrant l'ensemble du protéome HCMV, une analyse complète des réponses T CD4⁺ et T CD8⁺ face au HCMV a été réalisée. Ces données ont montré que, dans une grande cohorte de donneurs séropositifs sains (de type HLA variable), une réponse des T CD4⁺ ou T CD8⁺ était détectable avec plus de 150 ORF virales qui comprennent à la fois des protéines structurales et non structurales exprimées au cours de toutes les phases d'infection lytique (Sylwester et al., 2005).

La majorité des études *in vitro* portant sur la réponse T CD8⁺ utilisent des lymphocytes T spécifiques de deux antigènes immunodominants : IE et pp65. En réponse au HCMV, les T CD8⁺ sont capables d'être cytotoxiques (granzymeB⁺, perforin⁺) et de produire de nombreuses cytokines telles qu'IFN- γ , TNF et MIP1 β (Zhou et al., 2009). Le phénotype des T CD8⁺ varie en fonction du stade de l'infection. La population effectrice lors de la phase aiguë a un phénotype CD45RA-CD45RO⁺CD27⁺ et CD28^{+/-} (phénotype central mémoire). En

revanche lors de la phase chronique ces cellules expriment le CD45RA (phénotype de différenciation terminale).

b) Les lymphocytes T CD4⁺

Dans un premier temps, l'importance des T CD4⁺ dans la réponse anti-CMV a été mise en évidence chez la souris. Il a été observé une augmentation d'incidence de réactivation virale dans des souris infectées par le MCMV et déplétées en T CD4⁺ (Polic et al., 1998). Les T CD4⁺ participent aussi au contrôle de l'infection dans des souris déplétées en T CD8⁺ (Jonjic et al., 1990).

Chez l'Homme, l'importance des T CD4⁺ a été démontrée depuis environ 20 ans, lorsqu'il a été observé que le maintien de T CD8⁺ spécifiques du HCMV était dépendante de la présence de T CD4⁺ (Walter et al., 1995). Une augmentation de la fréquence de T CD4⁺ chez les personnes saines séropositives pour le HCMV est corrélée à une immunité anti-HCMV efficace. Le rôle des T CD4⁺ lors de l'infection par le HCMV a aussi été montré chez les patients immunodéprimés transplantés chez lesquels une fréquence faible de T CD4⁺ spécifiques chez ces patients est corrélée avec une fréquence importante de complications liées au HCMV (Sester et al., 2005). Chez des patients transplantés de reins infectés, les patients asymptomatiques ont une réponse des T CD4⁺ spécifiques du HCMV qui précède la réponse des T CD8⁺ (ayant un rôle crucial dans la réponse anti-HCMV), alors que chez les patients symptomatiques cette réponse est retardée et détectable seulement après un traitement antiviral (Gamadia et al., 2003). L'importance des T CD4⁺ est également soutenue par de nombreuses études chez les patients transplantés de moelle osseuse (Jackson et al., 2011).

Ces T CD4⁺ participent à la réponse anti-HCMV, de façon indirecte, en particulier par l'aide qu'ils apportent aux T CD8⁺, effecteurs majeurs dans la réponse antivirale (réponse de type Th1). Il a été mis récemment en évidence que les T CD4⁺ produisent de l'IL-2 lors de l'infection par le HCMV et celle-ci augmenterait l'activité cytotoxique des cellules NK face à des macrophages infectés (Wu et al., 2015). Cependant, il a aussi été démontré un rôle direct des T CD4⁺ sur le contrôle de l'infection par le HCMV car ils peuvent être aussi cytotoxiques ou induire l'apoptose des cellules infectées (Elkington et al., 2004). Ceci pourrait faire intervenir la production de cytokines pro-inflammatoires IFN- γ et de TNF par des T CD4⁺ spécifiques du HCMV (IE1) à l'origine d'une inhibition de la réplication virale dans les cellules infectées (Davignon et al., 1996).

Tout comme les T CD8⁺, les T CD4⁺ sont capables de reconnaître un grand nombre de protéines virales structurales et non structurales. Des peptides issus de protéines très précoces telles que IE1 et IE2, des protéines tégumentaires comme pp65 ou bien encore la glycoprotéine d'enveloppe gB peuvent être reconnus par les T CD4⁺. De plus, chez une

personne âgée, environ 10% de T CD4+ mémoires sont spécifiques du HCMV (Sylwester et al., 2005). De façon intéressante, il a été démontré récemment que les T CD4+ sont aussi capables de reconnaître des antigènes induits durant la latence (UL138 et LUNA). Cependant ces T CD4+ ont une polarisation différente de celle décrite précédemment (profil Th1) et produisent une cytokine immunosuppressive, l'IL-10 (Mason et al., 2013). Ceci suggère que le HCMV induit des réponses T CD4+ immunosuppressives durant la latence, ce qui lui permet de pouvoir persister dans l'organisme de l'hôte.

c) Les lymphocytes T régulateurs

Chez la souris, il a été mis en évidence une activité de T régulateurs producteurs d'IL-10 qui peut déprimer la réponse immunitaire anti-MCMV (Jost et al., 2014). Ces cellules sont capables de réguler l'activation des NK lors d'une infection MCMV (Sungur et al., 2013).

Chez l'Homme de récentes études ont examiné le rôle des T régulateurs lors d'une infection HCMV. La fréquence de T régulateurs induits spécifiques du HCMV serait augmentée chez des personnes âgées séropositives (Terrazzini et al., 2014). Cependant, à l'heure actuelle, le lien entre cette population de T régulateurs et les maladies associées est encore mal défini.

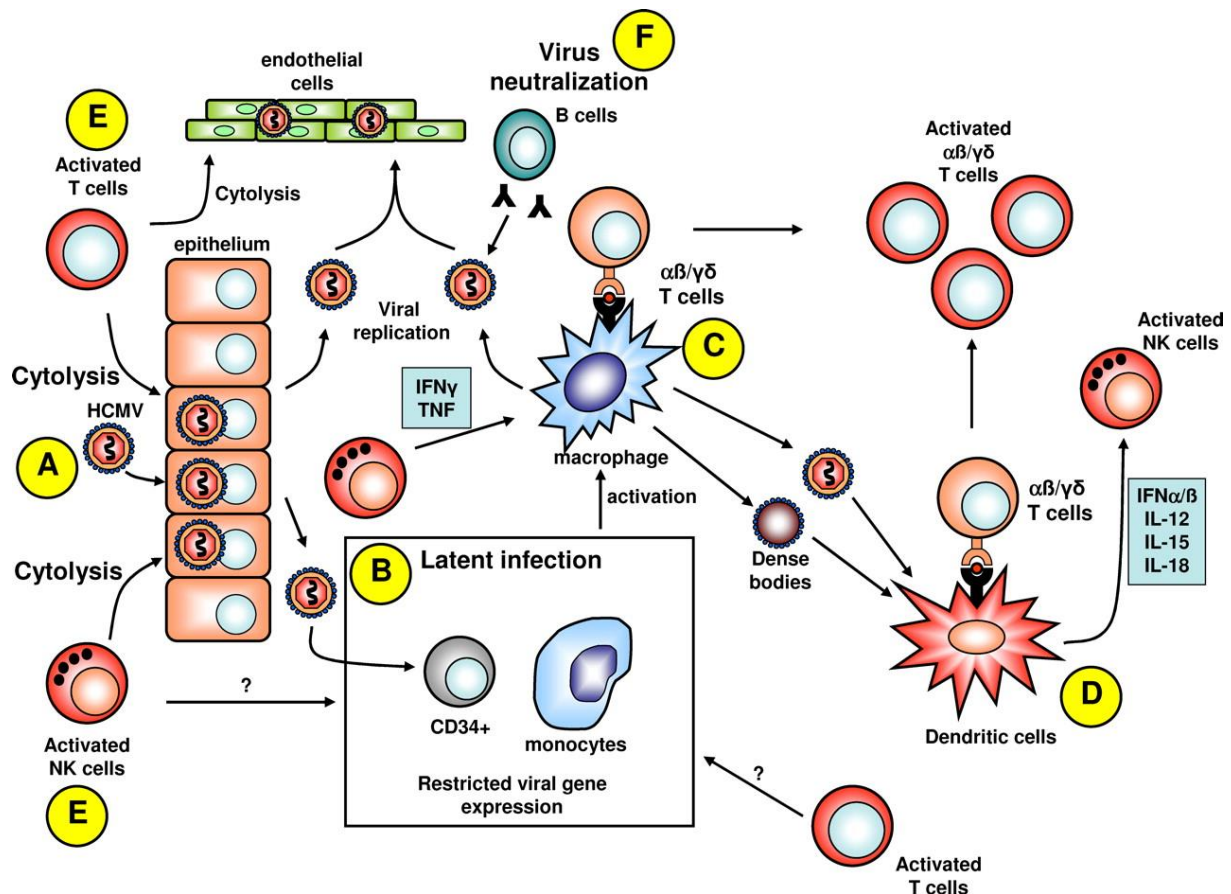


Figure 23 : Contrôle du HCMV par l'immunité innée et adaptative

L'infection primaire par le HCMV chez des individus en bonne santé commence dans l'épithélium des muqueuses (A). Le virus se dissémine ensuite dans les cellules myéloïdes dont les monocytes et les cellules CD34+, dans lesquels il établira une latence (B). Une expression restreinte des gènes viraux est observée dans ces cellules infectées de façon latente ce qui limite leur reconnaissance par les cellules immunitaires effectrices. La différenciation des monocytes infectés en macrophages ou cellules dendritiques peut être à l'origine d'une infection productive (C). Les particules virales ou les corps denses (particules virales défectives) peuvent être présentés par les cellules dendritiques pouvant alors stimuler les cellules T spécifiques de l'antigène viral (D). Les cellules dendritiques activées via leur TLR peuvent sécréter des cytokines permettant l'activation de cellules effectrices de la réponse innée telles que les cellules NK (D). Les macrophages infectés peuvent aussi directement activer les T spécifiques de l'antigène viral (C). Ces T activés (CD4, CD8 ou $\gamma\delta$) et les cellules NK peuvent directement lyser les cellules infectées par cytolysse ou bloquer la réplication virale par la sécrétion de cytokines telles que l'IFN- γ ou encore du TNF (E). Une autre réponse importante est médiée par les lymphocytes B activés qui sont capables de contrôler la dissémination de virions libres par la production d'anticorps neutralisants (F) (Crough and Khanna, 2009)

III. Mécanismes d'échappement du HCMV au système immunitaire

Comme la majorité des herpesvirus, le HCMV a développé de nombreux mécanismes d'échappement aux acteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative, lors d'infection productive mais aussi durant la latence.

De façon générale, le HCMV est capable de moduler ces réponses immunitaires en augmentant l'expression de récepteurs et cytokines homologues à ceux couramment observés lors d'une infection. Ainsi, différents gènes viraux, UL33, UL78, US27 et US28 codent pour des récepteurs homologues aux récepteurs des chimiokines (Chee et al., 1990). De plus d'autres gènes codent des cytokines homologues à IL-10 (UL111.a), à l'IL-8 (UL146) un homologue du récepteur au TNF (UL144), ainsi que de nombreux gènes anti-apoptotiques (UL36, UL37).

Le HCMV est également capable d'échapper aux cellules de l'immunité innée et adaptative en modulant des éléments clés spécifiques de l'activation de ces dernières.

A. Echappement virale à l'immunité innée

L'activation des cellules NK dépend de signaux activateurs et inhibiteurs. Le HCMV peut contrôler l'activation de ces cellules et leur cytotoxicité en favorisant des signaux inhibiteurs ou bien en diminuant des signaux activateurs.

1. Modulation des récepteurs inhibiteurs des cellules NK

Le CMH-I est reconnu par les récepteurs inhibiteurs Leukocyte Ig-like receptor (LIR-1) et les Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) présents sur les cellules NK. Le HCMV est capable de produire une protéine homologue du CMH-I : UL18 (Beck and Barrell, 1988). Ainsi, cette protéine UL18 se retrouve exprimée à la surface de la cellule infectée et se lie aux récepteurs inhibiteurs LIR-1 des cellules NK avec une affinité aussi élevée que les molécules de CMH-I classiques (Chapman et al., 1999) ce qui a pour conséquence l'inhibition de l'activation des cellules NK LIR-1+ (**Figure 24**) (Prod'homme et al., 2007).

De plus, le HCMV utilise la voie d'expression de la molécule HLA-E pour inhiber l'activation des cellules NK via les récepteurs inhibiteurs CD94/NKG2A. La molécule HLA-E n'est exprimée que si elle est complexée avec des peptides issus de certaines protéines (CMH en particulier). La protéine UL40 du HCMV est capable d'entrer dans le réticulum endoplasmique et d'être chargée par les molécules HLA-E, ce qui entraîne leur expression à

la surface des cellules infectées (**Figure 24**). Ainsi, Les cellules NK NKG2A+ sont inhibées par liaison avec ce complexe UL40/HLA-E (Tomasec et al., 2000).

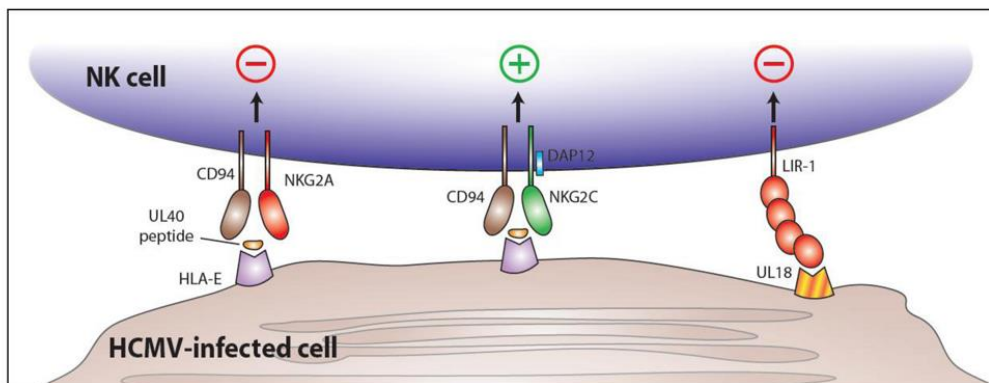


Figure 24 : Reconnaissance de protéines HCMV par les cellules NK

La protéine UL40 contient un épitope qui est reconnu par la molécule HLA-E, et est présentée à la surface de la cellule infectée. UL40/HLA-E se lie au récepteur inhibiteur CD94/NKG2A entraînant un signal inhibiteur. Cependant, UL40/HLA-E peut aussi se lier au récepteur activateur CD94/NKG2C entraînant dans ce cas un signal activateur. En parallèle, la protéine UL18 est exprimée à la surface de la cellule infectée et se lie au récepteur inhibiteur LIR-1, menant à une inhibition des cellules NK (Sun and Lanier, 2009).

2. Modulation des récepteurs activateurs des cellules NK

En réponse au stress induit par l'infection HCMV, les cellules peuvent avoir une expression augmentée de molécules de stress telles que les molécules MICA/B et ULBP1-6, qui sont des ligands du récepteurs activateurs NKG2D. Cependant tous les MIC/ULBP ne sont pas toujours exprimés en fonction du type cellulaire infecté. Le HCMV produit des protéines qui interfèrent avec l'expression de ces ligands. UL16 lie les protéines MICB et ULBP1, 2 et 6 et empêche ainsi leur transport à la surface (Rolle et al., 2003) (**Figure 25**). La traduction de la protéine MICB est aussi inhibée par un microARN du HCMV, UL112 (Stern-Ginossar et al., 2007). UL142 quant à elle, entraîne la rétention de MICA dans le cis-Golgi.

De plus la signalisation induite par d'autres récepteurs activateurs peut être modulée par le HCMV. Ainsi, la protéine tégumentaire pp65 (UL83) se lie au récepteur activateur NKp30 ce qui entraîne la dissociation de la chaîne CD3 ζ associée pour la transduction du signal activateur et une inhibition de l'activité cytotoxique des cellules NK (Arnon et al., 2005). UL141 entraîne une diminution d'expression de CD155 et CD112 (ligands du récepteur activateur DNAM-1) à la surface des cellules infectées (Tomasec et al., 2005).

La protéine UL40 du HCMV peut également être chargée par les molécules HLA-E, l'ensemble étant reconnu par des récepteurs activateurs CD94/NKG2C (**Figure 24**).

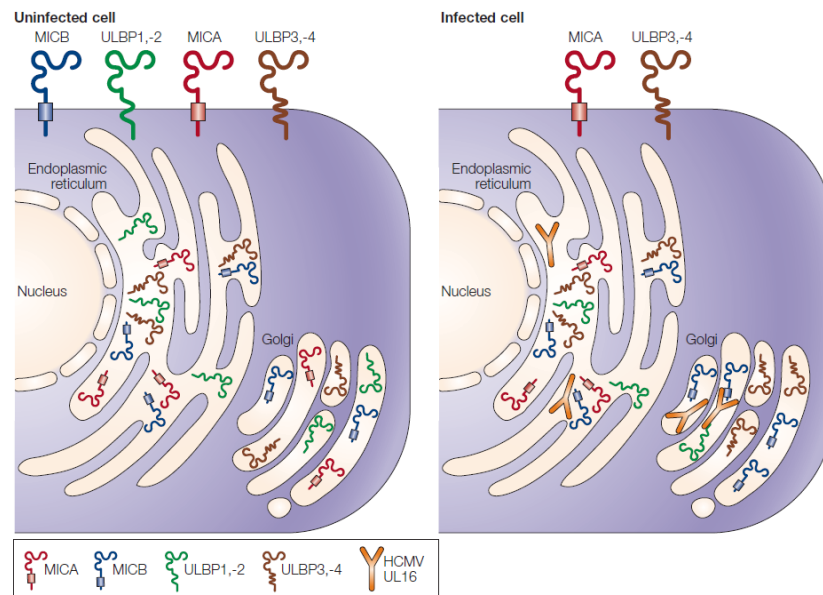


Figure 25 : Diminution d'expression des ligands du NKG2D par UL16

La protéine UL16 du HCMV lie les molécules MICB, ULBP1-2 ce qui entraîne leur rétention dans le Cis-Golgi. Les autres ligands du NKG2D, c'est-à-dire MICA et ULBP3-4 ne sont pas affectés par UL16 et sont donc exprimés à la surface de la cellule infectée (Lodoen and Lanier, 2005)

B. Immunité adaptative : modulation de la présentation antigénique

1. Baisse d'expression du CMH-I

Les T CD8+, acteurs majeurs de la réponse immunitaire anti-HCMV, sont activés par des peptides présentés par les molécules de CMH-I. Ainsi, le HCMV a mis en place de nombreux mécanismes d'échappement aux T CD8+ en interférant dans la voie de présentation de ces molécules à la surface (Noriega et al., 2012). En effet, lors d'une infection par le HCMV, les gènes viraux US2, 3, 6, 10 et 11 induisent la baisse d'expression du CMH-I (**Figure 26 et 27**). US2 et US11, produits précocement durant l'infection, induisent la dégradation des molécules de CMH-I (Wiertz et al., 1996). US3 et US10 entraînent la rétention du CMH-I dans le réticulum endoplasmique (Jones et al., 1996). US6, quant à lui, induit un changement de conformation des protéines de transport antigéniques (TAP) ce qui bloque la translocation de peptides antigéniques dans le réticulum endoplasmique et empêche ainsi l'expression normale des complexes CMH-peptides (Ahn et al., 1997).

Des protéines du tégument sont aussi impliquées dans la diminution d'expression du CMH-I sur les cellules infectées. La phosphoprotéine pp65 qui a une activité de kinase, peut phosphoryler la protéine IE, ce qui bloque la présentation des épitopes associés par les molécules de CMH-I (Gilbert et al., 1993). La protéine pp71 retarde la translocation du CMH-I du réticulum endoplasmique au cis-Golgi.

Un microARN viral, miRNA US4-1, cible l'ARN messager codant pour ERAP-1, une aminopeptidase qui est impliquée dans la génération de certains peptides antigéniques et impacte ainsi leur présentation normale par le CMH-I (Kim et al., 2011).

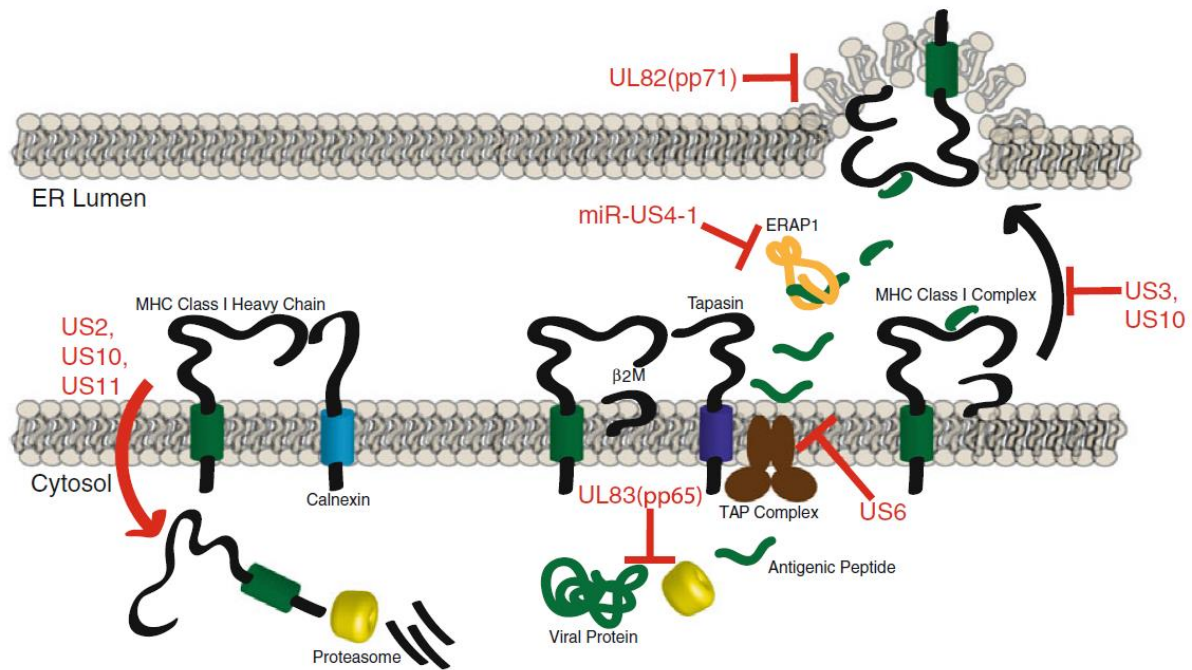


Figure 26 : Diminution d'expression des molécules de CMH-I par le HCMV

Les protéines US2, 10 et 11 induisent la dégradation du CMH-I par le protéasome. La phosphoprotéine pp65 phosphoryle certains peptides, ce qui empêche le chargement de ceux-ci par le CMH-I. US6 inhibe TAP ce qui bloque le transport de peptides dans le RE. US3 et 10 entraînent la rétention des CMH-I dans le RE. MiR-US4-1 bloque la traduction d'ERAP-1 inhibant ainsi le chargement des peptides sur le CMH-I. Quant à pp71, elle induit une rétention du CMH-I dans le Cis-Golgi. (Noriega et al., 2012)

2. Baisse d'expression du CMH-II

Le HCMV a aussi mis en place un mécanisme d'immuno-échappement aux T CD4+, cellules qui sont activées par des peptides présentés par les molécules de CMH-II (**Figure 27**). Ainsi US2 du virus est capable d'induire la dégradation par le protéasome des molécules de CMH-II, prévenant ainsi la reconnaissance par les T CD4+ (Tomazin et al., 1999). US3 réduit la présentation par les molécules de CMH-II en se liant aux chaînes α/β nouvellement synthétisées, bloquant ainsi l'association de ces dernières avec la chaîne invariante Ii (Hegde et al., 2002).

3. Intérêt physiologique

Bien que le HCMV code pour de nombreuses protéines (appelées « immunoévasines ») altérant la présentation des antigènes aux T CD4+ et TCD8+, la réelle contribution de ces dernières lors de l'infection est mal connue. En effet, au vu du nombre important de T CD8+ et TCD4+ spécifiques du HCMV retrouvé chez des individus séropositifs, nous pourrions imaginer que ces protéines n'ont pas un rôle majeur lors de l'infection (Noriega et al., 2012). Cependant, les T CD8+ spécifiques du HCMV issus de donneurs séropositifs ont une activité cytotoxique et une sécrétion de cytokine plus élevée en présence de souches virales délétées d'US2 et US11, (Khan et al., 2005). De plus, la présence des immunoévasines US2, 3, 6 et 11 est requise pour la réinfection de macaques par le CMV (Hansen et al., 2010). Ces études démontrent que ces immunoévasines sont importantes lors d'une réinfection, favorisant ainsi un échappement au T CD8+ *in vivo*. Cependant, l'importance de ces molécules est démontrée lors de réinfection mais pas lors de primo-infection.

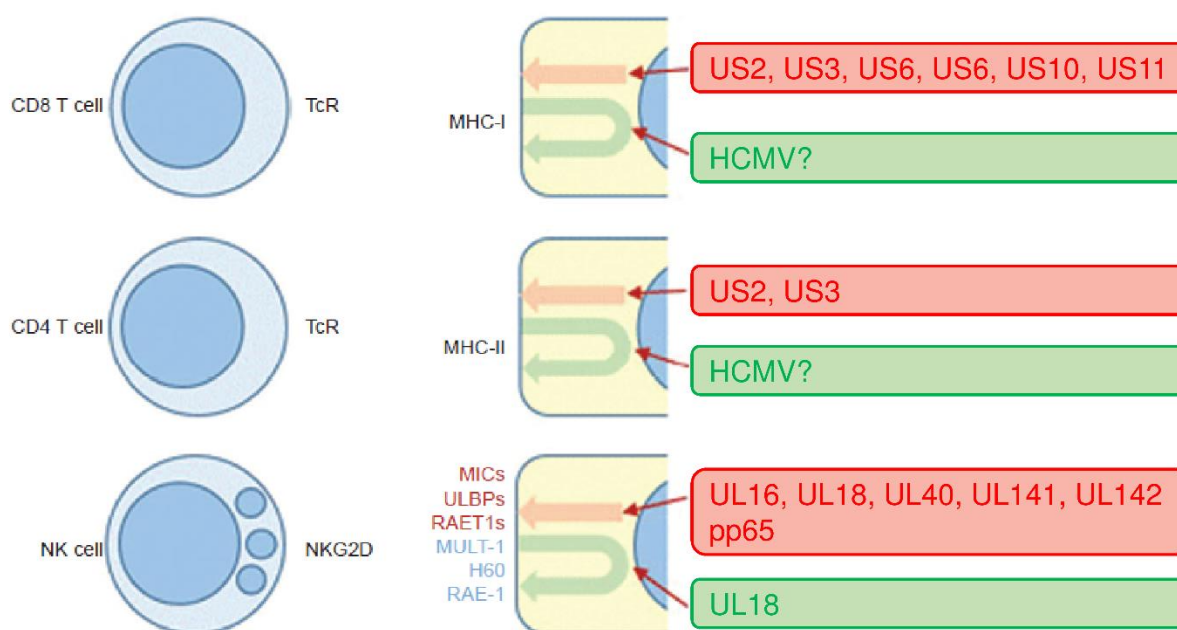


Figure 27 : Effets majeurs des immunoévasines du HCMV

La voie de sécrétion apparaît en orange et la voie d'endocytose en vert. Les immunoévasines jouant sur ces deux voies sont listées à droite. Modifiée d'après (Lucin et al., 2015).

C. Latence du HCMV

L'échappement du HCMV au système immunitaire est important lors de sur-infection ou lors de réactivation virale, c'est-à-dire lorsque l'infection est dite productive. Cependant, le HCMV échappe également au système immunitaire en établissant une latence dans certaines cellules.

L'un des mécanismes majeurs d'immuno-échappement du virus durant la latence est l'inhibition de la différenciation des progéniteurs myéloïdes CD34+ en cellules dendritiques. L'infection *in vitro* de monocytes altère leur différenciation en cellules dendritiques : les cellules dendritiques dérivées de monocytes infectés ont un phénotype et une fonction altérée en raison du blocage de la voie du GM-CSF (facteur de différenciation des cellules dendritiques) (Carlier et al., 2011). De plus, les cellules dendritiques infectées par le HCMV ont des capacités d'endocytose, de phagocytose et de migration réduites.

La région UL111.a du HCMV code pour une cytokine immunosuppressive homologue à l'IL10 (cmv-IL10) (Kotenko et al., 2000). Cette cytokine est présente dans des cellules infectées de façon latente et productive *in vitro*, et a été retrouvée dans des cellules mononuclées du sang d'individus séropositifs (Jenkins et al., 2004). Cmv-IL10 inhibe la maturation des cellules dendritiques et altère leur fonction (Chang et al., 2004). De plus, elle induit une diminution de l'expression des molécules de CMH-I et CMH-II sur ces cellules et inhibe ainsi les réponses immunes T-dépendantes (Spencer et al., 2002). La diminution des molécules de CMH-II est aussi retrouvée sur des progéniteurs myéloïdes CD34+ infectés de façon latente, ce qui diminue aussi les réponses T CD4+ spécifiques durant la latence (Cheung et al., 2009).

OBJECTIFS DU PROJET

Lors d'une infection congénitale, le HCMV peut être responsable de pathologies graves à la naissance telles que des retards mentaux ou des troubles neurosensoriels. Il peut être également responsable de complications sévères comme des atteintes viscérales ou des rétinites chez des patients immunodéprimés. Chez un individu sain immunocompétent, l'infection est généralement asymptomatique, mais le virus a pour particularité de persister dans le noyau de précurseurs hématopoïétiques, ce qui en fait des cellules réservoirs du HCMV. Ce virus latent peut être réactivé, et être responsable de complications sévères chez des individus immunodéprimés.

Lors d'une infection par le HCMV, il a été démontré une expansion de la population lymphocytaire T V δ 2neg, alors que la population T V γ 9V δ 2 ne semble pas naturellement activée dans ce contexte infectieux. Les T V γ 9V δ 2 ont été décrits pour leur propriétés antivirales contre certains agents viraux tels que le coronavirus, VIH, HCV, Influenza ou encore EBV. Cependant, l'interaction possible entre les T V γ 9V δ 2 et des cellules infectées par HCMV n'a jamais été étudiée. Par ailleurs, il est connu que le HCMV a développé des mécanismes d'échappement au système immunitaire, notamment contre les cellules NK, en modulant l'expression de ligands de récepteurs NKR. Les cellules T V γ 9V δ 2 exprimant elles aussi des NKR, nous pouvons penser que les cellules infectées puissent échapper aux T V γ 9V δ 2 pour les mêmes raisons qu'elles échappent aux cellules NK. Cependant, l'effet d'un traitement par ABP, molécules favorisant l'accumulation de P-Ags reconnus par ces lymphocytes T V γ 9V δ 2, n'a jamais été étudié lors d'une infection par HCMV. Nous avons donc fait l'hypothèse qu'en favorisant la stimulation du TCR $\gamma\delta$ des T V γ 9V δ 2 à l'aide d'un traitement des cellules cibles par les ABP, nous pourrions induire une reconnaissance des cellules infectées par le HCMV.

Des études préliminaires ont été réalisées dans le laboratoire pour étudier l'effet des ABP sur l'activité des T V γ 9V δ 2 contre des cellules infectées par le HCMV *in vitro*. Pour cela, des fibroblastes embryonnaires humains (MRC-5) ont été infectés par le HCMV, traités avec des ABP, puis co-cultivés en présence de T V γ 9V δ 2. D'après les résultats, les ABP permettent une activation préférentielle de certaines fonctions des T V γ 9V δ 2 lorsqu'ils reconnaissent les cellules infectées. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une immuno-stimulation des T V γ 9V δ 2 pourrait être utilisée à des fins antivirales. Ainsi, mon projet de thèse a consisté à analyser le potentiel antiviral des T V γ 9V δ 2 au cours des infections par le HCMV, en particulier dans le cadre d'une immuno-stimulation par les ABP.

Dans un premier temps, l'objectif de ma thèse a été de caractériser l'effet d'un traitement ABP des cellules infectées par le HCMV sur l'activation des différentes fonctions

effectrices des T V γ 9V δ 2. Nous avons étudié cette activation en présence de différents types cellulaires permissifs pour HCMV et avec différentes souches virales. D'autre part, nous avons également voulu déterminer quelles étaient les conséquences de cette activation des T V γ 9V δ 2 sur les cellules infectées en analysant la réplication et la production virale en présence de T V γ 9V δ 2.

Le deuxième objectif a été d'étudier cette synergie entre le traitement ABP et l'infection du HCMV afin de préciser les mécanismes par lesquels le virus induit un stimulus pour les T V γ 9V δ 2.

RESULTATS

(Article et résultats supplémentaires)

Publication soumise en juillet 2015

(Journal of Immunology)

TITLE

Aminobisphosphonates synergize with HCMV to activate the antiviral activity of V γ 9V δ 2 cells^a

RUNNING TITLE

Sensing of HCMV by V γ 9V δ 2 T cells

AUTHORS

Charline Daguzan ^{*, †, ‡, §}, Morgane Moulin ^{*, †, ‡, §}, Hanna Kulyk-Barbier [¶],

Christian Davrinche ^{*, †, ‡, §}, Suzanne Peyrottes ^{||}, and Eric Champagne ^{*, †, ‡, §}

AFFILIATIONS

^{*} Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, France

[†] INSERM, U1043, Toulouse, France

[‡] CNRS, UMR5282, Toulouse, France

[§] Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France 1

[¶] Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, INSA, UMR INSA/CNRS 5504 - UMR INSA/INRA 792, Toulouse, France

^{||} Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247 CNRS-UM-ENSCM, Montpellier, France

CORRESPONDENCE

Eric Champagne, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, CHU Purpan, BP 3028, 31024 Toulouse, CEDEX 03, France

Mail : eric.champagne@inserm.fr

Fax : (33) 562744558

Phone : (33) 562748369

Abstract

Human V γ 9V δ 2 T cells are activated through their TCR by neighbouring cells producing phosphoantigens. Zoledronate (ZOL) treatment of cells induces intracellular accumulation of the phosphoantigens IPP and Apppl. Immunomanipulation of V γ 9V δ 2 lymphocytes with these drugs is exploited for anti-cancer immunotherapy but few attempts were made to use it in chronic viral infections. Although V γ 9V δ 2 T cells seem to ignore HCMV-infected cells, we examined if they can sense HCMV when a TCR stimulus is provided with ZOL.

Fibroblasts treated with ZOL activate V γ 9V δ 2 T cells to produce IFN- γ but not TNF. Following the same treatment, HCMV-infected fibroblasts stimulate TNF secretion and an increased production of IFN- γ , indicating that V γ 9V δ 2 cells can sense HCMV infection. Quantification of intracellular IPP/Apppl following ZOL treatment showed that HCMV infection boosts their accumulation, explaining the increased lymphokine secretion. Increased lymphokine production was observed with most clinical isolates and laboratory HCMV strains, HCMV-permissive astrocytoma or dendritic cells, and “naïve” as well as activated V γ 9V δ 2 cells.

Using an experimental setting where infected fibroblasts were co-cultured with $\gamma\delta$ cells in sub-micromolar concentrations of ZOL, we show that V γ 9V δ 2 cells suppressed substantially the release of infectious particles while preserving uninfected cells. V γ 9V δ 2 cytotoxicity was decreased by HCMV infection of targets while anti-IFN- γ and anti-TNF antibodies significantly blocked the anti-viral effect. Our experiments indicate that cytokines produced by V γ 9V δ 2 T cells have an antiviral potential in HCMV infection. This should motivate *in vivo* studies to explore the possible antiviral effect of immunostimulation with ZOL in this context.

Introduction

In humans, $\gamma\delta$ T cells represent 1-5% of peripheral T cells and are subdivided in subsets expressing preferential combinations of variable γ and variable δ TCR regions. The largest subset in humans expresses a TCR with variable $\gamma 9$ and $\delta 2$ regions (GV2S1/DV102S1 according to the official WHO nomenclature; thereafter referred to as $V\gamma 9V\delta 2$ cells), is absent in rodents and expands *in vivo* or *in vitro* after contacting cells producing or loaded with small phosphorylated compounds called phosphoantigens. Exogenous phosphoantigens are produced by several bacteria and parasites and thus $V\gamma 9V\delta 2$ cells are components of the innate defense against these pathogens (Eberl et al., 2003). Endogenous phosphoantigens such as isopentenyl pyrophosphate (IPP) are also ubiquitously produced by eukaryotic cells as intermediates of the mevalonate pathway (Tanaka et al., 1995). IPP accumulation occurs naturally in some tumors following perturbation of this pathway but it can also be induced by aminobisphosphonate (ABP) drugs. ABPs limit bone resorption and this property is widely used in the clinic for treatment of demineralizing diseases such as osteoporosis, rheumatoid arthritis, Paget disease and cancer metastases. More recently it has been demonstrated that they block the mevalonate pathway enzyme farnesyl pyrophosphate synthase and subsequently promote intracellular IPP accumulation in target cells (Thompson et al., 2002). This promotes the recognition and killing of tumors by $V\gamma 9V\delta 2$ cells (Gober et al., 2003; Thompson et al., 2002) and this property is exploited in anti-cancer immunotherapeutic approaches using ABPs (Kobayashi and Tanaka, 2015). Multiple clinical trials have been performed to evaluate the beneficial effect of $V\gamma 9V\delta 2$ T cell stimulation by ABPs in conjunction with IL-2 administration and encouraging results have been obtained, showing the relative safety and adjuvant potential of this approach for anti-tumor therapy (Kobayashi and Tanaka, 2015) and for restoring immune competence in HIV patients (Poccia et al., 2009).

The $V\gamma 9V\delta 2$ T cell response to APB-induced phosphoantigen accumulation is TCR- and CD277 (butyrophilin BTN3A1)-dependent (Chien et al., 2014; Dimova et al., 2015; Harly et al., 2014). Intracellular phosphoantigens can bind to the cytoplasmic domain of BTN3A1,

and this interaction is sensed by the V γ 9V δ 2 TCR in a manner which is still incompletely understood but may involve a conformational rearrangement of BTN3 and other protein complexes such as periplakin and F1-ATPase, conferring the cells an increased sensitivity to V γ 9V δ 2 killing activity (Rhodes et al., 2015; Sandstrom et al., 2012; Scotet et al., 2005; Vavassori et al., 2013; Wang et al., 2013).

Non-V δ 2 $\gamma\delta$ T cells expand in response to acute HCMV infections in immuno-compromised patients or following placental infections, where they are thought to provide some protection in conjunction with CD8 and NK cells (Lafarge et al., 2001). Although alterations of the V γ 9V δ 2 subset are observed in multiple viral contexts such as HIV or HCV infections (Agrati et al., 2011; Cimini et al., 2012; Cimini et al., 2013; Cummings et al., 2008), the role of these cells is not clear. Human V γ 9V δ 2 cells that have been activated *in vivo* with ABPs can control influenza virus-mediated disease after transfer in RAG-deficient mice (Tu et al., 2011). Thus, V γ 9V δ 2 cells, as well as non-V δ 2 subsets could possibly exert anti-viral activity either naturally or following specific immuno-stimulation.

HCMV is a β -Herpesvirus which replicates in epithelial, endothelial, fibroblasts and other cell types following primo-infection, and persists life-long in a latent state in myeloid lineage cells which constitute a reservoir for subsequent reactivation, with deleterious consequences in immuno-compromized individuals. There is at present no possibility to clear HCMV infection. HCMV persistence are largely influenced by viral factors which interfere with apoptosis and with the MHC-class I peptide antigen presentation pathway allowing the escape of infected cells from CD8 T cells (Lucin et al., 2015). In addition, several viral micro RNAs and proteins down-modulate the expression of stress molecules on the surface of HCMV-infected cells. This is the case for UL16-binding proteins (ULBP) and MHC class I chain-related (MIC) antigens which stimulate activating receptors on NK cells and $\gamma\delta$ cells (Fielding et al., 2014; Halenius et al., 2015).

The present study was undertaken to examine *in vitro* the immune-therapeutic potential of V γ 9V δ 2 immuno-manipulation in the context of HCMV infection since pharmacological

stimulation of these cells is more readily achievable than that of non-V δ 2 cells. How V γ 9V δ 2 cells behave when they are challenged with HCMV-infected cells and the effect of V γ 9V δ 2-specific immune-manipulation have not been reported. Although V γ 9V δ 2 cells do not normally recognize HCMV-infected targets, we show here that viral infection provides a potent additional stimulus when stimulating cells are concomitantly treated with ABPs. Consequently, doses of ABP which do not promote full activation of V γ 9V δ 2 cells by uninfected targets allow their activation by infected cells and subsequent inhibition/limitation of viral replication.

Material and methods

Cells and culture medium

Unless otherwise indicated, cultures were performed in complete medium (CM) containing RPMI1640-glutamax, sodium pyruvate, penicillin, streptomycin and 10% heat-inactivated FCS (all reagents from Life Technologies).

Healthy donors PBMC were purified on ficoll from buffy coats obtained from the *Etablissement Français du Sang*. MRC-5 (Human embryonic lung fibroblasts, from Seromed) and U-373MG (Human astrocytoma, from ATCC) were maintained and infected with HCMV in DMEM-Glutamax medium (Life Technologies) supplemented with 10% heat-inactivated FCS, sodium pyruvate and antibiotics.

Monocyte-derived dendritic cells (DC) were generated as described previously (Carrier et al., 2011). In brief, CD14⁺ cells were purified from PBMC by positive magnetic sorting (Miltenyi Biotec kit) and put to differentiate in CM containing IL-4 and GM-CSF (Miltenyi Biotec, 50ng/ml and 20ng/ml respectively) for 5 days.

For production of short term V γ 9V δ 2 T cell lines, PBMC were isolated from healthy donor buffy coat samples (obtained from the *Etablissement Français du Sang*). $\gamma\delta$ T cells were purified by magnetic sorting with anti-TCR γ/δ microbeads (Miltenyi Biotec) and V γ 9V δ 2 cells (1×10^6) were expanded with the (E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate (HDMAPP) phosphoantigen (Tebu-Bio; 10nM) and IL-2 (400iu/ml, after 48h) in presence of irradiated autologous PBMC (30Gy; 15×10^6 cells) and a mix of allogeneic lymphoblastoid cells (50Gy, 1.5×10^6 cells) in CM, in a final volume of 10ml. The cell concentration was kept close to 10^6 cells/ml by adding fresh medium and IL-2 every 2-3 days. After 19-22 days of culture, the percentage of V γ 9V δ 2 T cells was checked (usually >99% V γ 9⁺). If necessary, non- $\gamma\delta$ cells were eliminated by negative magnetic sorting (Miltenyi Biotec) and cells were frozen.

Virus strains, virus titration, inactivation and infections

HCMV-AD169 was from ATCC. The endothelial cell-adapted strains VHL/E and TB40/E GFP were provided by C. Sinzger (Tubingen, Germany) and M. Messerle (Hanover, Germany) respectively. Clinical isolates CON and TRI were provided by F. Halary (Nantes, France). All strains were amplified once on MRC-5 fibroblasts and collected from supernatants by ultracentrifugation at 70000g for 40min and frozen in aliquots. Virus titers (fluorescent focus forming units, ffu/ml) of viral stocks and culture supernatants were determined after infection of MRC-5 cells with serial dilutions, followed by immuno-staining of fibroblast layers at day 2 with anti-CMV-IE antibody and determination of ffu counts by immunofluorescence microscopy.

Viral inactivation by UV irradiation was performed by putting the virus suspension in an Eppendorf tube 3 cm below a Spectroline UV light (0.17Amp) for 20min. For heat inactivation the viral suspension was put at 65°C for 30min in a dry heating block.

HCMV infection of cell lines and fibroblasts were performed by adding virus dilutions to sub-confluent (~80%) monolayers of cells, after having determined cell density to adjust for the desired multiplicity of infection (MOI). Cells were washed after 3h. For the infection of DCs, the virus (VHL/E) was added to the cell suspension in culture wells (10^6 cells/ml) at an MOI of 5.

Detection of HCMV proteins by immunofluorescence microscopy

Cell monolayers in microtiter plates were washed with PBS, fixed with formaldehyde (4% in PBS, pH7.3) for 15min at room temperature and permeabilized for 15min in PBS containing 10mM Hepes, pH7.3, 3% bovine albumin and 0.1% Triton X100. Cells were stained with anti-HCMV-IE1/2 (anti-IEA, Bio-Mérieux, France) or anti-pp28 (5C3, Abcam) followed by FITC-coupled anti-IgG F(ab')₂ antibody (Beckman-Coulter), both steps at room temperature for 2h. Nuclei were then stained with DAPI (1µg/ml) and fluorescence images were acquired using a Zeiss Apotome microscope (wide field mode). For the quantitative evaluation of viral

replication, images corresponding to nuclei staining for HCMV proteins (green channel) and total nuclei (DAPI, blue channel) were analyzed with the ImageJ™ software and the automatic counting function. Two fields (~600nuclei/field) were acquired for each well with the 10X objective and counts were averaged.

Quantitative RT-PCR for IE-mRNA expression

Cells were harvested and total RNA was isolated using the GenElute Mammalian Total RNA kit, Sigma-Aldrich). Reverse transcription was performed on 0.5µg of total RNA (Super Script III, Life Technologies) and real time quantitative PCR was performed using the SYBR Green I Master system and LightCycler 480 (Roche). GAPDH was used as the endogenous control. The following primers were used (5' to 3'):

GAPDH(forward): TCATTTCCTGGTATGACAACG; GAPDH(reverse):
TCTTACTCCTTGGAGGCCAT; HCMV-IE(forward): AACATAGTCTGCAGGAACGTC;
HCMV-IE(reverse): CCAAGAGAAAGATGGACCCTG.

The efficiency of amplification with all primer pairs was >0.98 and the specificity of amplification products was checked by denaturation curve analysis.

⁵¹Cr-release assay

Adherent fibroblasts were labeled in flat bottom microtiter wells (7500 cells/well) with 1µCi of ⁵¹Cr-sodium chromate (Perkin Elmer) in 40µl of CM for 1h and washed three times with 150 µl of RPMI medium. Vγ9Vδ2 effector T cells were added (100µl) at the indicated effector:target ratio, spun briefly to pellet cells and incubated 4h at 37°C. Cell-free supernatants (70µl) were transferred to Lumaplates (Perkin-Elmer) and counted using a TopCount (Perkin-Elmer) counter. Spontaneous and maximum release values were determined for each target with a specific treatment (infection and/or zoledronate), and were averaged from triplicates. Spontaneous release (spont) was determined from wells containing target cells only; maximum release (max) was obtained by replacing effector cells by 100µl of 1% Triton X-100. The percentage of specific lysis (%SL) was calculated as follows:

$$\%SL = 100 \times [cpm_{\text{sample}} - cpm_{\text{spont}}] / [cpm_{\text{max}} - cpm_{\text{spont}}].$$

Measure of cytokine expression

IFN- γ and TNF release in supernatants were measured by a standard ELISA (BD biosciences kit) 48h after addition of V γ 9V δ 2 T cells in co-cultures with adherent cells in 96-well microtiter plates. In experiments with fresh PBMC, cytokine expression was measured by FACS: adherent MRC-5 fibroblasts (2×10^5 cells) were cultured, infected and treated with ZOL in 24-well plates. Total PBMC (10^6 cells/well) were added for 16h in CM, and brefeldin A ($5 \mu\text{g/ml}$) was added during the last 4h of co-culture. Non-adherent lymphocytes were then harvested, washed, and surface-stained with anti-V γ 9-PC5 monoclonal antibodies (Beckman-Coulter), then fixed and permeabilized with the Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences) and stained with anti-IFN- γ -FITC and TNF-PE (BD-Biosciences). After washing, fluorescence was acquired on an LSR-II cytofluorometer (BD-Biosciences) and analyzed with the FlowJo software (TreeStar).

Co-cultures with $\gamma\delta$ T cells

Short-term co-cultures of V γ 9V δ 2 T cell lines with adherent targets were performed at a 1:1 and 5:1 ratio for cytokine and cytotoxicity measurements respectively. In these experiments, adherent targets were plated in 96-well microtiter plates and infected for the indicated time. When present, mevastatin, pamidronate (Sigma-Aldrich) and ZOL (Novartis) were added after infection at the indicated time and concentration before co-culture and were washed out before the addition of T cells.

A different setting was used for prolonged 6-day co-cultures of V γ 9V δ 2 cells with infected adherent cells to evaluate the level of viral replication. ZOL was added (0.05 to $0.4 \mu\text{M}$) to adherent cells 24h before infection, to the culture medium in the T cell suspension and with fresh medium replacement at day 3 of the co-culture to maintain the same final concentration. Microplates were used for immunofluorescence analysis (15×10^3 fibroblasts/well); for

quantitative RT-PCR analysis of viral RNA and for the titration of live virus in supernatants, parallel co-cultures were performed in 24-well plates (2×10^5 fibroblasts/well), with an identical effector:target ratio of 0.2:1 and an MOI of ~0.2.

The role of IFN- γ and TNF in co-cultures was assessed by adding anti-IFN- γ (B27, IgG1), anti-TNF (Mab1, IgG1) antibodies and IgG1 control antibodies in the culture medium (10 μ g/ml) at the start of the co-culture and at day 3 with medium change. All antibodies were azide-free and endotoxin-low, and were purchased from (Pharmingen).

Quantification IPP and Apppl by ion chromatography-coupled tandem mass spectrometry (IC-MS/MS)

MRC-5 fibroblasts were cultured in 6-well plates to 80% confluence (10^6 cells in 2ml of CM) and infected with HCMV-AD169 (MOI=1) for 48h or 96h. ZOL was added at the indicated concentration during the last 16h of culture. At the end of the culture, the fibroblast layer was washed twice with cold PBS and the plates were put on liquid nitrogen for fast freezing. The plate was then taken out and 5ml of cold lysis solution (acetonitrile:methanol:water, 4:4:4) and 180 μ l of the isotope dilution mass spectrometry standard (IDMS) were added to ensure accurate quantification. Lysates were harvested in 15ml-polypropylene tubes by scrapping, vortexed extensively and insoluble material was removed by quick centrifugation. Samples were evaporated under vacuum in a SpeedVac (SC110A SpeedVac Plus, ThermoSavant, USA) for 6h and then stored at -80°C for further use. Dried samples were resolubilized in 100 μ l of milliQ water and IPP and triphosphoric acid 1-adenosin-5'-yl ester 3-(3-methylbut-3-enyl) ester (Apppl) were analyzed and quantified by ion chromatography coupled with a triple quadrupole mass spectrometer (IC-MS/MS) using the isotope dilution mass spectrometry (IDMS) method (Wu et al., 2005).

Liquid anion exchange chromatography was performed with the Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-5000+ Reagent-Free™ HPIC™ system (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA) equipped with an eluent generator system (ICS-5000 EG, Dionex) for automatic

base generation (KOH). Analytes were separated within 45min, using a linear KOH gradient elution applied to an IonPac AS11 column (250 x 2mm, Dionex) equipped with an AG11 precolumn (50 x 2mm, Dionex) at a flow rate of 0.35ml/min. The gradient was as follows: equilibration with 0.5mM KOH, 1.1min, KOH ramp from 0.5mM to 4.1mM, 1 to 9.5min, constant concentration 5.1min; isocratic ramp to 9.65mM in 9.4min; isocratic ramp to 60mM in 8min; isocratic ramp to 90mM in 0.1min; constant concentration 6.9min; drop to 0.5mM in 0.1min; equilibration at 0.5mM KOH for 1.9min. The column and autosampler temperature were thermostated at 29°C and 4°C respectively. The injected sample volume was 15µl. Measures were performed in triplicates from separate cultures.

Tandem mass analyses were carried out in the negative mode with a 4000 QTRAP hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (AB Sciex, Foster City, CA, USA) equipped with a Turbo V source (AB Sciex/MDS Sciex, Toronto, Canada) for electrospray ionization. The MRM approach was used for quantification of IPP and Apppl and was done by collision-activated dissociation using nitrogen as the collision gas at medium pressure. The nebulizer gas pressure was 50psi, the desolvation gas pressure was 60psi, the temperature was 55°C, and the capillary voltage was 4.2kV. Instrument control, data acquisition, and data analysis were performed with the Analyst® version 1.5.2 software.

The MRM transitions used for quantification of the IPP and Apppl were 245.0->79.0 and 574.1->79.0 respectively. For absolute quantification of IPP and Apppl the IPP U-¹³C MRM transition was taken.

To determine the method's linearity, the limit of detection (LOD) and of quantification (LOQ), mixtures of the standard compounds at various concentrations (0.005–5µmol/l) were analyzed. A linear range was observed between 0.01 and 5µmol/l for both IPP and Apppl. For further quantification, linear ranges were chosen between 0.1-2.5 µmol/l and 0.01-0.3 µmol/l for IPP and Apppl, respectively. The variation of the ratio peak area ¹²C/U-¹³C with the concentration of ¹²C standard was given by the linear regression equations: $y = 93.747x - 4.3075(\mu\text{mol/l})$, $R = 0.9992$ ($n = 5$) for IPP; $y = 248.06x + 0.6977(\mu\text{mol/l})$, $R = 0.9995$ ($n = 5$) for Apppl, where R is the correlation coefficient and n is the number of points. The LOD and LOQ

for IPP and Apppl were 0.1 and 0.3 μ mol/l (IPP) and 0.01 and 0.03 μ mol/l (Apppl) respectively, calculated by using the calibration curve method with the following equations: $LOD = 3S_{y/x} \div b$ and $LOQ = 10 S_{y/x} \div b$, where (b) is the intercept of regression line and ($S_{y/x}$) is the standard deviation of the intercept.

Statistical analyses

Most analyses were performed with Prism Version 5 software (GraphPad). Non parametric Wilcoxon test was used for all single point comparisons. ExcelStat software was used for covariance analyses in antibody blocking experiments: in this case, p values were calculated for slope and intercept of regression lines, and the lowest p value only is indicated. A p value <0.05 was considered significant.

Results

Lymphokine secretion by V γ 9V δ 2 cell lines

We wanted to know if V γ 9V δ 2 T cells could detect signs of infection by HCMV. To this end we challenged short term V γ 9V δ 2 cell lines (>95%V γ 9⁺) with MRC-5 fibroblasts which were infected or not with the HCMV-AD169 laboratory strain and we measured IFN- γ and TNF secretion, the main cytokines produced by V γ 9V δ 2 cells. In the absence of additional stimulus, no significant lymphokine secretion was detected. Then we tested whether infection could be sensed by V γ 9V δ 2 T cells after treatment of fibroblasts with ABPs to promote intracellular production of phosphoantigens and provide a specific stimulation of the V γ 9V δ 2 TCR (Fig.1). To this end HCMV-infected and control uninfected fibroblasts were treated 16h with various doses of ZOL. When V γ 9V δ 2 cells were stimulated with ZOL-treated uninfected fibroblasts, increasing amounts of IFN- γ were released in response to increasing doses of ZOL, whereas TNF secretion was barely detectable. When V γ 9V δ 2 cells were challenged with infected ZOL-treated cells, large and dose-dependent amounts of TNF were released and IFN- γ production was increased. The effect of viral infection on IFN- γ and TNF release was abrogated by virus inactivation by UV or heat treatment (65°C, 30min) (Fortunato et al., 2000) and was thus dependent on viral transcription and/or replication (**Fig.1A**).

The stimulatory activity of ABP-treated fibroblasts increased with the length of infection, from 24 to 96h (**Fig1B,C**). Longer infection times were not tested because virus cycle completion induced significant fibroblast lysis. HCMV infection of fibroblasts also increased the IFN- γ response of V γ 9V δ 2 T cells when another ABP, pamidronate, was used instead of ZOL (**Fig.1C**). No significant IFN- γ and no TNF were detected in control fibroblast cultures without $\gamma\delta$ cells, treated or not with ABPs, infected or not (**Fig1C and data not shown**). Thus viral replication in AD169-infected fibroblasts synergizes with ABP treatment for the stimulation of IFN- γ and TNF secretion by V γ 9V δ 2 cells.

Figure 1

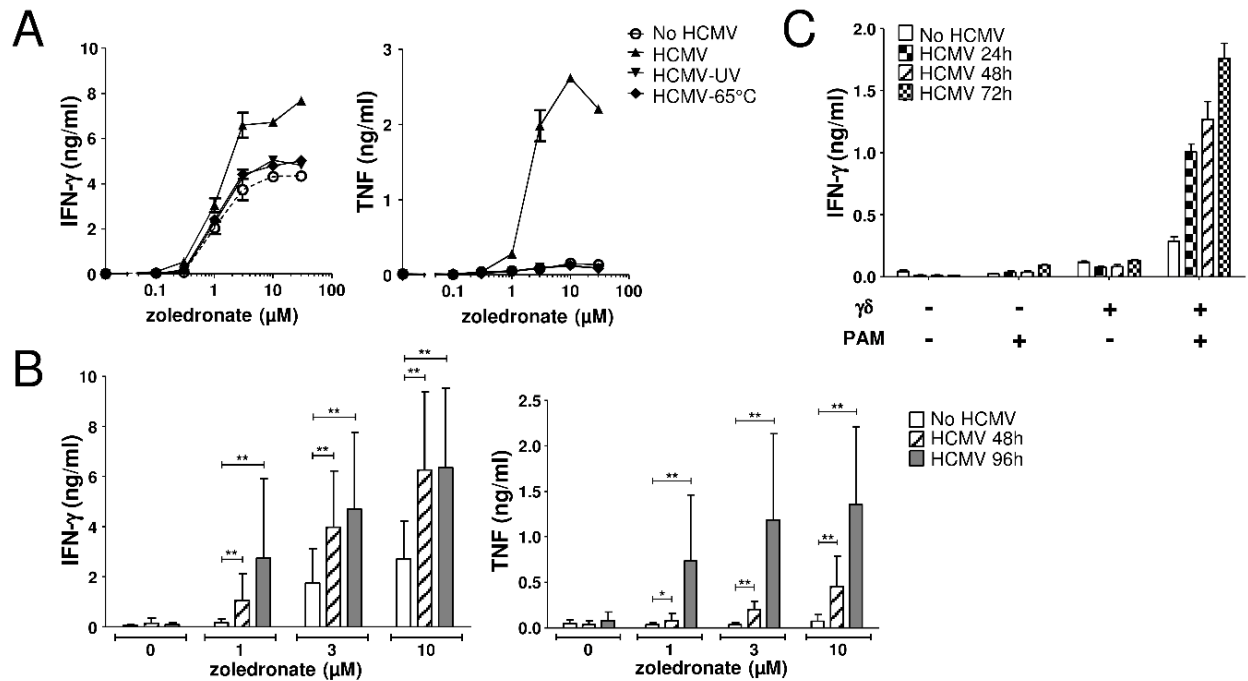


Figure 1: Lymphokine secretion by V γ 9V δ 2 cell lines stimulated with HCMV-infected fibroblasts

V γ 9V δ 2 T cell lines were co-cultured in micro-culture wells with MRC-5 fibroblasts (1:1 ratio) that had been infected with HCMV (AD169, MOI=1) and treated with aminobisphosphonates. IFN- γ and TNF production were quantified by ELISA after 48h. **A**, MRC-5 cells were either mock infected (no virus), infected with untreated HCMV (AD169 strain, MOI=1), or infected with heat-inactivated (65°C, 30min) or UV-irradiated virus, during 72h before co-culture. Zoledronate was added during the last 16h and washed before addition of $\gamma\delta$ cells (mean \pm SD of triplicate cultures, representative experiment out of three). **B**, MRC-5 were infected or not with AD169 (MOI=1) 48h or 96h and treated by zoledronate 16h before co-culture with $\gamma\delta$ cells; mean of 9 independent experiments performed in triplicates. **C**, MRC-5 cells were infected with AD169 during 24-48-72h and treated or not with pamidronate (PAM, 100 μ M) 16h before co-culture with $\gamma\delta$ cells or medium only to check for cytokine secretion by fibroblasts (mean of triplicate cultures).

Error bars indicate SD; * P < 0.05 (Wilcoxon's test).

HCMV infection modulates endogenous production of phosphoantigens

The effect of HCMV infection on the V γ 9V δ 2 T cell response could result from several non-exclusive mechanisms, including induction of ligands for costimulatory molecules such as NKG2D ligands (MICA/B and ULBP proteins) or modulation of molecules involved in the sensing of phosphoantigen such as BTN3A1. Blocking NKG2D ligands with NKG2D-Fc had no effect on above responses and we could not demonstrate any modulation of BTN3A1 on infected cells, although V γ 9V δ 2 T cell stimulation was abolished by anti-BTN3 antibody 103.2 (Harly et al., 2012), confirming the absolute need for phosphoantigen sensing (data not shown).

ABPs inhibit the mevalonate pathway enzyme farnesyl pyrophosphate synthase and promote accumulation of V γ 9V δ 2 T cell agonists such as IPP and Apppl. Nevertheless they also affect cellular metabolism independently of farnesyl pyrophosphate synthase inhibition (Nussbaumer et al., 2011; Schmidt et al., 1996; Skorey et al., 1997). To check that V γ 9V δ 2 T cell activation by ZOL-treated MRC5 cells, infected or not, was dependent on modulation of the mevalonate pathway, fibroblasts were treated with mevastatin for 24h prior to addition of ZOL to block the synthesis of mevalonate and downstream metabolites. Mevastatin treatment of fibroblasts abrogated IFN- γ and TNF production by V γ 9V δ 2 cells in a dose-dependent manner (**Fig.2A**). Then we then measured the intracellular concentration of endogenous phosphoantigens in ZOL-treated fibroblasts, infected or not, using ionic chromatography coupled to tandem mass spectrometry. The limits of detection and of quantification were 0.1 and 0.3 μ M (IPP) and 0.01 and 0.03 μ M (Apppl) respectively. Note that our procedure does not distinguish IPP and Apppl from their respective isomers DMAPP and ApppD (Jauhainen et al., 2009). The intracellular amounts of IPP and of its adenylated derivative Apppl (Vantourout and Hayday, 2013) were both increased in a dose-dependent manner after ZOL treatment. Importantly, the amount of both metabolites was strongly increased when cells had been infected for 48h. Intracellular IPP decreased but was still elevated in cells that had been

infected for 96h, whereas Apppl returned below the limit of detection (**Fig.2B**). This indicates that HCMV infection boosts the accumulation of endogenous phosphoantigens following ZOL treatment and explains, at least in part, the synergy between ZOL and HCMV for $V\gamma 9V\delta 2$ stimulation.

Figure 2

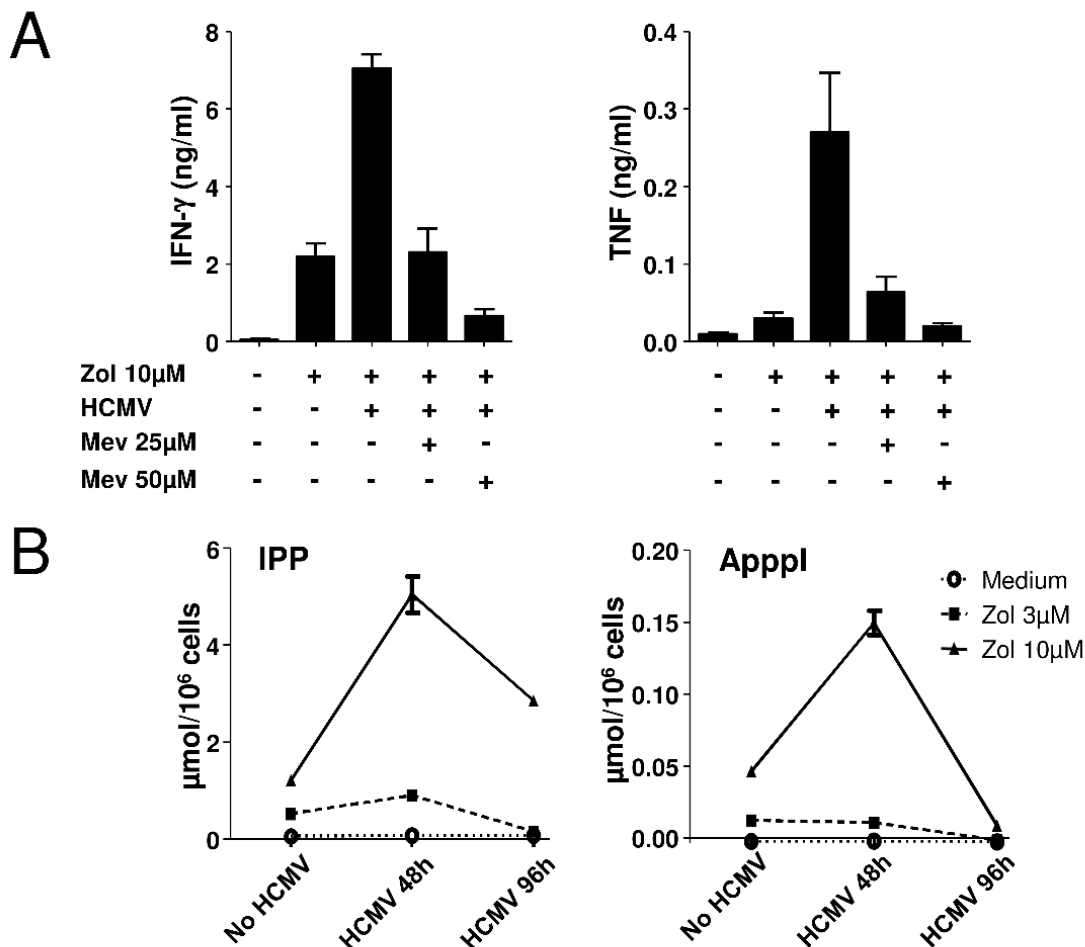


Figure 2: Involvement of the mevalonate pathway and phosphoantigen production

A, MRC-5 fibroblasts were infected with HCMV-AD169 (MOI=1) during 72h. $V\gamma 9V\delta 2$ T cells were then added and IFN- γ and TNF production were quantified as in Fig1a; in some cultures mevastatin (or control solvent) and zoledronate were added 40h and 16h respectively before the addition of $\gamma\delta$ cells. Results are means \pm SD of triplicate cultures; representative experiment out of three. **B**, IPP and Apppl phosphoantigens were quantified by IC-MS/MS in cytosolic extracts from MRC-5 fibroblasts which had been either not infected, or infected with HCMV-AD169 (MOI=1) during 48 or 96h. In some cultures zoledronate was added at the indicated concentration during the last 16h of culture. Zol: zoledronate; Mev: mevastatin.

Influence of the HCMV strain and of the host cell type

The AD169 HCMV strain is a laboratory-adapted isolate and carries multiple genomic deletions which alter tropism and virus-host interactions (Cha et al., 1996). To see if other strains of HCMV could similarly boost lymphokine secretion by V γ 9V δ 2 T cells, we tested the laboratory strains VHL/E and TB40/E and two low-passage clinical isolates (CON, TRI). TB40/E did not increase significantly cytokine production whereas infection with other strains led to increased production of IFN- γ and TNF although their efficiency to promote TNF release was variable. Differences between strains for the speed of viral cycle progression are not excluded. Thus the V γ 9V δ 2 cell response is dependent on the virus but most tested HCMV strains, either being clinical isolates or laboratory-adapted strains, were able to boost cytokine secretion by V γ 9V δ 2 cells after ABP treatment (**Fig.3**).

Figure 3

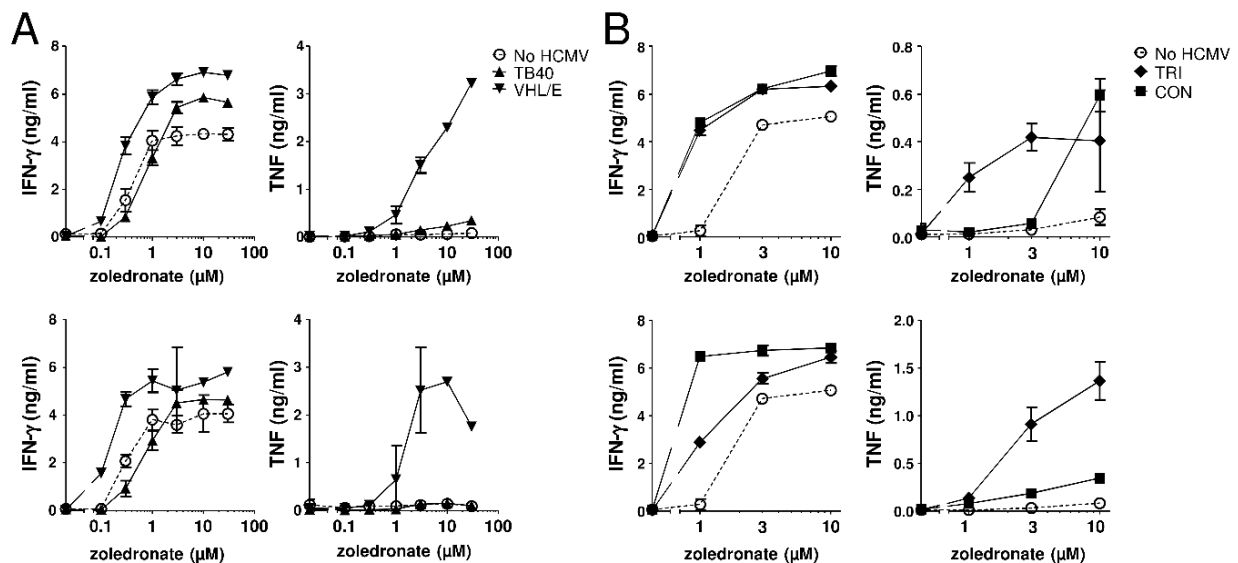


Figure 3: V γ 9V δ 2 lymphocyte sensing of infection with different HCMV strains

IFN- γ and TNF production by V γ 9V δ 2 T cell lines were quantified by ELISA after 48h of co-culture (1:1 ratio) with MRC-5 fibroblasts infected 48h (top panels) or 96h (bottom panels) before co-culture by different HCMV isolates (MOI=1): **A**, TB40/E and VHL/E are laboratory-adapted strains; **B**, CON and TRI are low-passage clinical isolates. Zoledronate was added 16h before co-culture and washed. Results are mean \pm SD of triplicate cultures. Each strain was tested at least twice with similar results.

As HCMV can infect multiple cell lineages *in vivo*, we also tested whether infection of other cell types could also stimulate lymphokine production. Infection of primary fibroblast instead of MRC-5 cells gave identical results (not shown). $V\gamma 9V\delta 2$ cell stimulation with the astrocytoma U-373MG treated with ZOL induced dose-dependent IFN- γ and TNF secretion in the absence of infection. Nevertheless, infection with either AD169 or VHL/E increased the production of both cytokines (**Fig.4A**). To see if $V\gamma 9V\delta 2$ cells were also able to sense HCMV infection in cells of the myeloid lineage, we produced monocyte-derived DCs by *in vitro* culture of sorted monocytes in the presence of IL-4 and GM-CSF for 5 days. *In vitro* differentiation of monocytes into DCs was checked by the loss of CD14 expression and upregulation of CD86; VHL/E was used because, unlike AD169, it is known to retain infectivity for myeloid cells. DC permissiveness was checked by the nuclear expression of HCMV-IE protein and was ~3-5% when using an MOI of 5 (**Supplemental Fig.1**). After infection with HCMV-VHL/E, DCs were treated with ZOL and co-cultured with $V\gamma 9V\delta 2$ cells. IFN- γ production in the presence of infected DC was increased compared with co-cultures with uninfected DC. TNF production remained very low even in co-cultures of $\gamma\delta$ cells with infected DCs (**Fig.4B**), possibly due to the relatively low percentage of cells expressing viral proteins. Thus HCMV infection stimulates the lymphokine response of $V\gamma 9V\delta 2$ cells in most combinations of viral strain and cellular target in the context of ZOL treatment although these factors influence qualitatively and quantitatively the responses of $V\gamma 9V\delta 2$ cells.

Figure 4

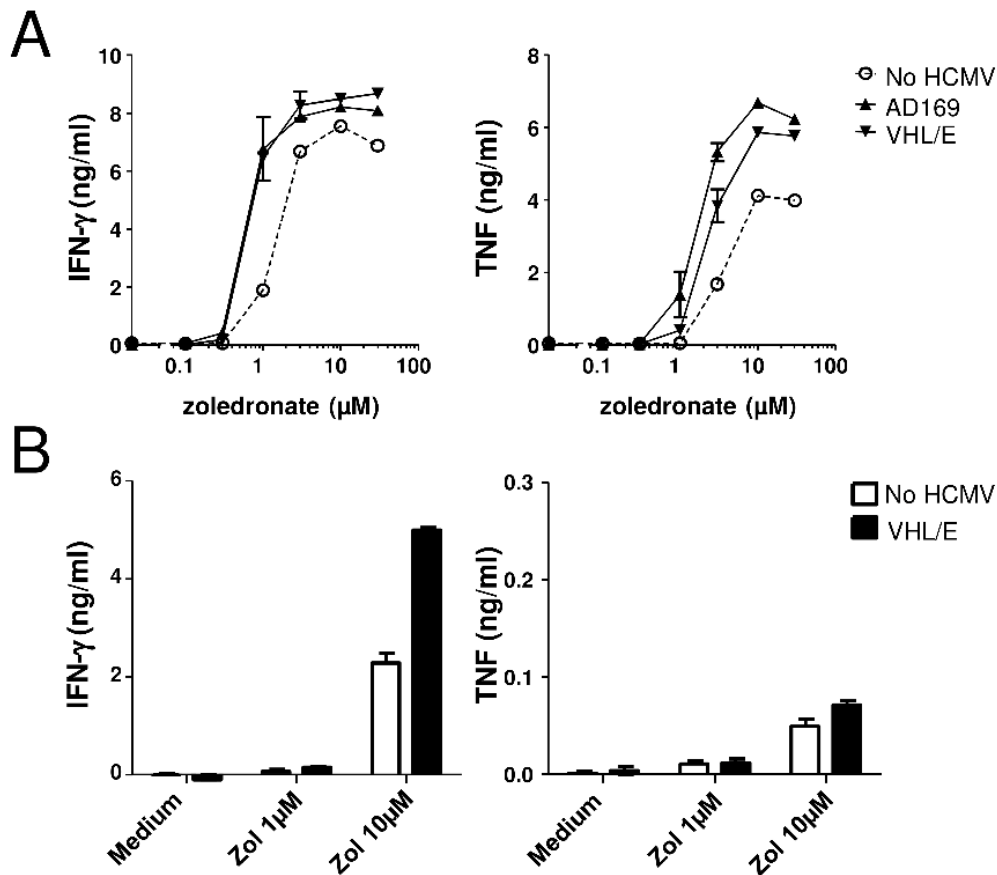


Figure 4: V γ 9V δ 2 lymphocyte sensing of infection with HCMV in non-fibroblast targets
IFN- γ and TNF production by V γ 9V δ 2 T cell lines were quantified by ELISA after 48h of co-culture with infected cells, treated or not with zoledronate during the last 16h. **A**, Astrocytoma cells U-373MG infected 48h before co-culture by AD169 and VHL/E (MOI=1); **B**, Monocyte-derived DC infected by VHL/E (MOI=5) five days post-differentiation of CD14⁺ cells in IL-4 and GM-CSF, treated with zoledronate (day 6) and co-cultured (day 7) with V γ 9V δ 2 cells during 48h. Results are means \pm SD of triplicate cultures.

Response of “fresh” V γ 9V δ 2 cells to HCMV-infected cells

All above experiments were performed using activated V γ 9V δ 2 cell lines obtained after their short term amplification from PBMC with HDMAPP phosphoantigen. As T cells that had not been primed *in vitro* may behave differently, we evaluated whether V γ 9V δ 2 cells from fresh PBMC samples could also be activated by ZOL-treated fibroblasts and whether HCMV

infection also affected their activation. In agreement with other reports (Miyagawa et al., 2001) the cytokine response of sorted fresh $\gamma\delta$ cells was undetectable (not shown) suggesting that they require accessory cells. Thus we co-cultured total PBMC with fibroblasts, infected or not with HCMV AD169 or VHL/E, and measured the specific activation of $V\gamma 9^+$ cells by intracellular staining of IFN- γ and TNF (**Fig.5**). In independent cultures with six different PBMC samples, the response of $V\gamma 9^+$ cells to uninfected, ZOL-treated fibroblasts was barely detected. This response was significantly higher when fibroblasts were infected with HCMV-AD169 or VHL/E and the majority of activated cells produced IFN- γ and TNF. This cytokine production was essentially confined to $V\gamma 9^+$ cells (**Fig.1A,B**). Thus fresh $V\gamma 9V\delta 2$ cells also respond by an increased lymphokine production when stimulated with HCMV-infected ZOL-treated fibroblasts.

Figure 5

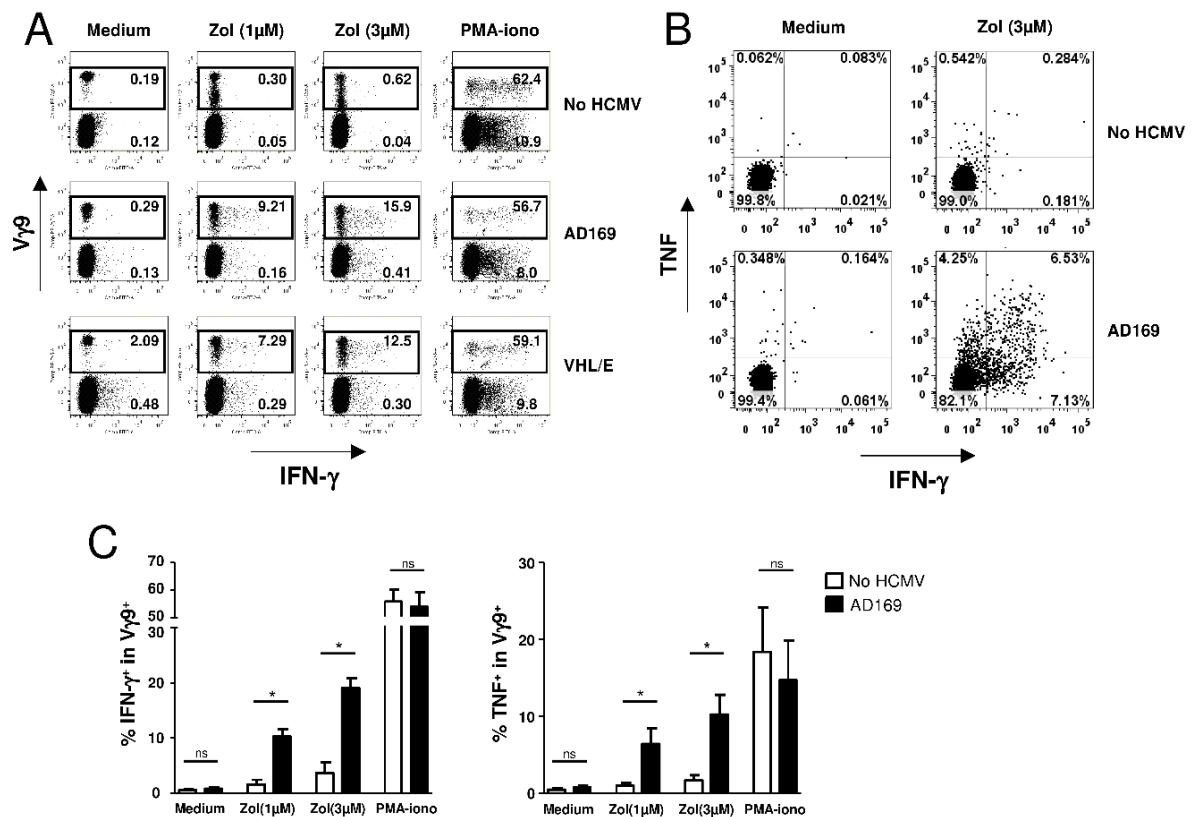


Figure 5: FACS analysis of fresh Vγ9+ cell responses to HCMV infected fibroblasts

MRC-5 fibroblasts were infected by HCMV (AD169 or VHL/E; MOI=1) for 48h and treated with zoledronate at the indicated concentration during the last 16h. Fresh unsorted PBMC were then added for 16h and brefeldin A was added during the last 4h of co-culture. In some cultures, PMA and ionomycin were added instead of zoledronate during 4h to assess maximal response. Non-adherent cells were then recovered, stained for surface Vγ9 expression and intracellular IFN-γ and TNF accumulation, and analyzed by FACS. **A-B**, Representative dot plots from one individual showing percentages of IFN-γ production in Vγ9+ gate and Vγ9- cells (A), and double staining for IFN-γ and TNF in Vγ9+ cells (B). **C**, Mean percentages +/-SD of IFN-γ and TNF-producing cells from 6 independent experiments with PBMC from different healthy donors.

* $P < 0.05$; ns: non significant (Wilcoxon's test).

Vγ9Vδ2 cells can control HCMV replication

The synergistic effect of ZOL and HCMV on cytokine release by Vγ9Vδ2 cells suggests that this drug could be used to specifically target infected cells and possibly limit viral amplification. The co-culture conditions used in above experiments to demonstrate the effect of HCMV on lymphokine secretion resulted in a rapid disruption of the fibroblast layer by

V γ 9V δ 2 cell lines even in the absence of infection and were not appropriate for examining viral amplification on a complete viral cycle (5-7 days). To evaluate the antiviral potential of V γ 9V δ 2 cells, we switched to cultures where ZOL was kept at a low concentration all along the co-culture with T cells. When the concentration of ZOL was kept below 0.5 μ M and the V γ 9V δ 2:fibroblast ratio around 1:5, uninfected fibroblasts were not altered and the layer was respected. A multiplicity of infection (MOI) of ~0.2 was used to allow quantification of the percentage of infected fibroblasts by fluorescence in all conditions. Fibroblasts were thus cultured in medium containing ZOL and subsequently infected with HCMV-AD169. Three hours after infection, a V γ 9V δ 2 cell line was added to the culture for 6 days. The replication cycle of HCMV was followed by monitoring HCMV-IE and -pp28 protein expression on the fibroblast layer, quantification of HCMV-IE (IE1+IE2) mRNA by quantitative RT-PCR in cell lysates, and quantification of infectious particles in supernatants (**Fig.6**). In the absence of $\gamma\delta$ cells, we observed only a slight decrease of the percentage of HCMV-IE⁺ cells in cultures containing ZOL up to 0.4 μ M, with no significant decrease of viral mRNA expression and only a slight decrease of virion release (about one log). In co-cultures with V γ 9V δ 2 cells, the percentage of HCMV-IE⁺ cells decreased gradually with increasing concentrations of ZOL to below 10% of the control level (**Fig.6A,B**). Similar results were obtained by monitoring late phase cytoplasmic HCMV-pp28 protein by fluorescence (**Supplemental Fig.2**). HCMV-IE mRNA expression was similarly decreased in cultures containing $\gamma\delta$ cells and ZOL (**Fig.6C**). The production of infectious virions in the co-culture supernatant dropped by approximately three orders of magnitude when V γ 9V δ 2 cells were present and with 0.2-0.4 μ M ZOL (**Fig.6D**). Thus V γ 9V δ 2 T cells can potentially limit HCMV replication in presence of sub-micromolar concentrations of ZOL.

Figure 6

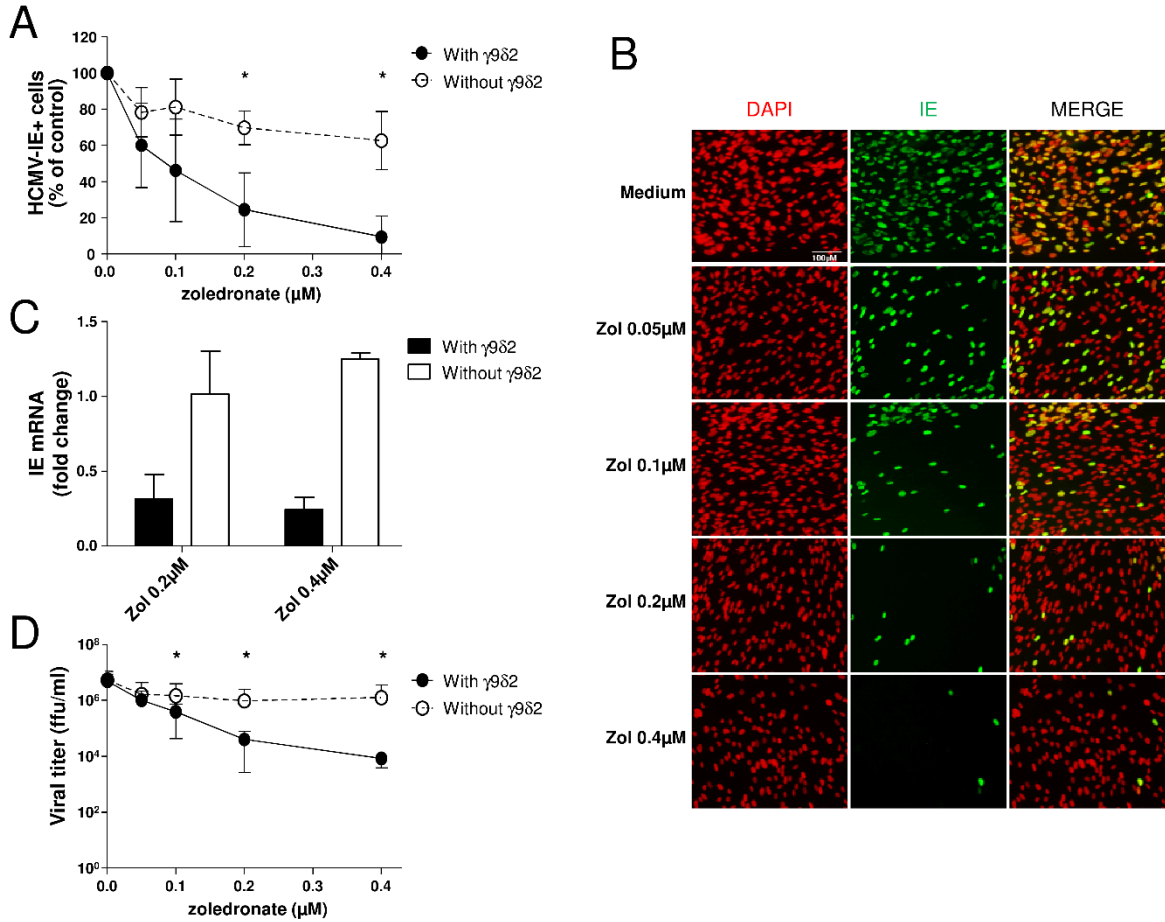


Figure 6: Limitation of HCMV replication by Vγ9Vδ2 T cells

A-B, MRC-5 were cultured in medium containing zoledronate at the indicated concentration and infected or not with HCMV (AD169, MOI=0.2) 3h before co-culture with or without Vγ9Vδ2 cells (T cell line; lymphocyte:fibroblast ratio of 0.2:1). Zoledronate was maintained in the medium throughout 6 days of co-culture. Non-adherent cells were then removed; the adherent fibroblast layer was fixed, stained with anti-IE antibodies (FITC, green) and DAPI (red), and analyzed by wide field fluorescence microscopy for nuclear staining. **A**, Cumulative data (n=6) from 3 independent experiments performed in duplicates cultures (3 optic fields, >1500nuclei for each culture) showing the percentage of infected cells (IE⁺ nuclei) among total nuclei (DAPI⁺). Results are expressed in % of the control (without zoledronate). **B**, Representative images obtained in co-cultures of infected fibroblasts with γδ cells, in the absence (medium) or presence of increasing doses of zoledronate. **C**, Cells were cultured as described above. At the end of the 6-day-co-culture, the fibroblast layer was recovered, total RNA was extracted and HCMV-IE mRNA expression was measured by quantitative RT-PCR. The results are expressed as the ratio of IE expression in cultures with ZOL over cultures without ZOL (fold change, 2^{-ΔΔCt}). Mean +/- SD of six cultures. **D**, Infectious HCMV particles in supernatants were titrated at the end of the 6-day co-culture by secondary infection of fibroblasts micro-cultures and immunofluorescence staining with anti-IE antibody and counting IE⁺ fluorescent focus forming units (ffu).

*P < 0.05 in Wilcoxon.

Role of cytokines and cytotoxicity in the control of infection

Activated V γ 9V δ 2 cells are known to develop a potent cytolytic activity in addition to their ability to produce inflammatory cytokines. We wished to determine which of their activities was determinant for the antiviral effect. We used ^{51}Cr -release assays to examine how HCMV infection affects fibroblast sensitivity to V γ 9V δ 2 killing activity, after ZOL treatment. This could only be evaluated in the initial co-culture conditions (**Fig.7A**). V γ 9V δ 2 cells displayed a moderate but significant cytolytic activity on ZOL-treated fibroblasts at an effector:target ratio of 5:1. This activity was strictly ZOL dose-dependent. HCMV infection of targets did not increase fibroblast lysis. Instead, they became resistant to lysis after 24-48h of infection. Thus cytolytic activity is unlikely to be responsible for the inhibition of viral replication in co-cultures with V γ 9V δ 2 cells.

IFN- γ and TNF produced by CD4 $^{+}$ cells have been shown to affect the replication of HCMV and other viruses (Davignon et al., 1996; Romero and Lavine, 1996). To see if they were involved in the antiviral effect of V γ 9V δ 2 cells, we used the co-culture system described in the previous section and monitored viral replication in the presence or absence of anti-IFN- γ and anti-TNF blocking antibodies. Both antibodies were able to restore partially viral amplification in co-cultures of ZOL-treated fibroblasts, with significant increase of the percentage of cells expressing the IE-protein, and a concomitant increase of infectious virions in the culture supernatant (**Fig.7B,C**). Thus the release of IFN- γ and TNF by V γ 9V δ 2 cells is probably the major mechanism by which V γ 9V δ 2 cells limit viral replication in this system.

Figure 7

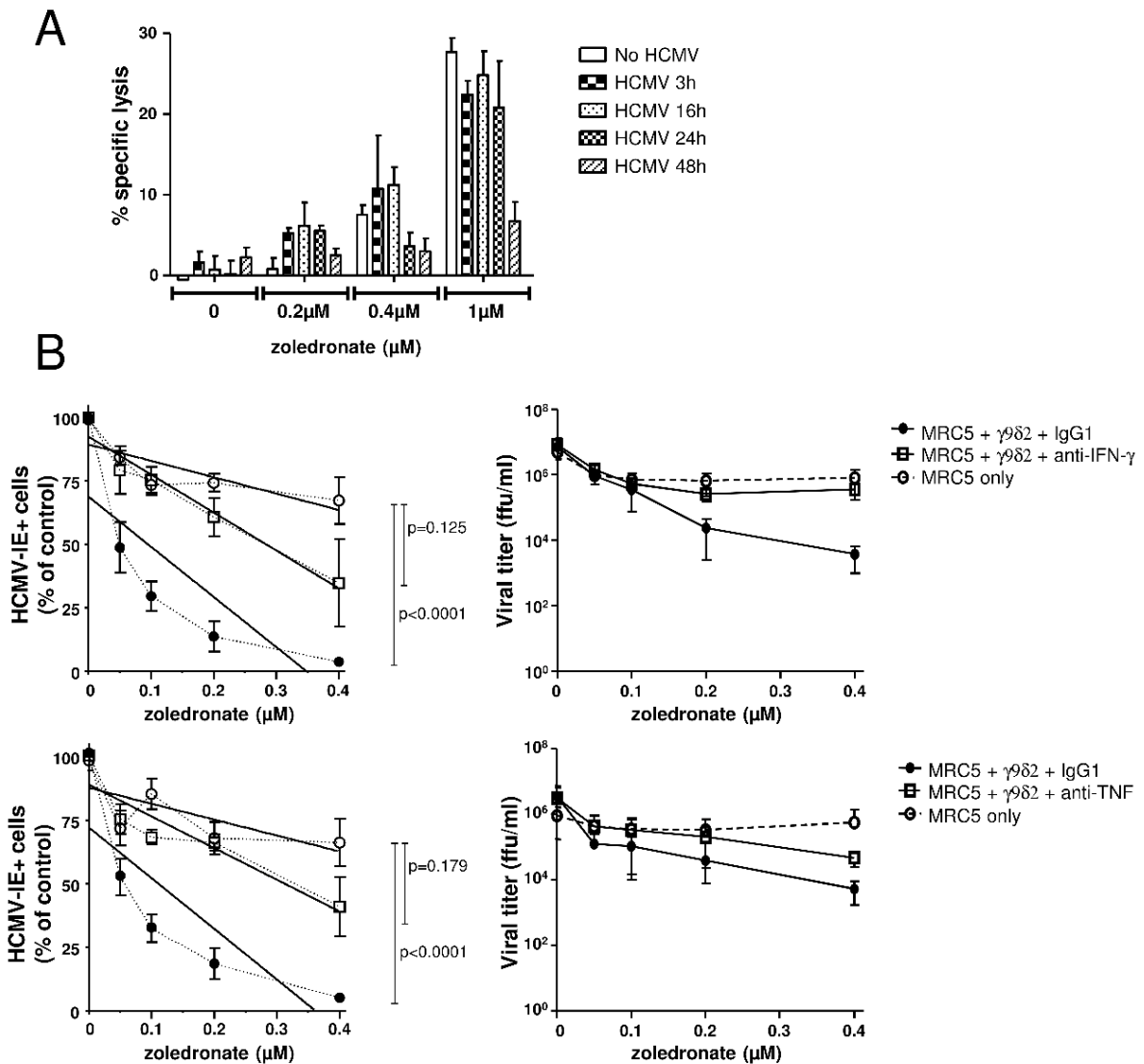


Figure 7. Role of cytokines and cytotoxicity in the antiviral effect of V γ 9V δ 2 cells

The cytolytic activity of V γ 9V δ 2 cell lines were measured by ^{51}Cr chromium release assays on MRC-5 cells that had been infected (MOI=1) during 3 to 48h or not, and treated or not with zoledronate for 16h. **A**, A representative experiment of 3 with different $\gamma\delta$ cell lines is shown. Results are expressed as the mean of specific lysis \pm SD of triplicate cultures. **B**, Co-cultures of MRC-5 cells with a V γ 9V δ 2 cell line were performed as described in Fig.6A,B except that anti-IFN- γ (top panels) , anti-TNF (bottom panels) or control antibodies were added in the cultures with $\gamma\delta$ cells. HCMV-IE expression on the fibroblast layer (left panels) and virus release (right panels) (as in Fig.6D) after 6 days were measured. Results are expressed as the mean \pm SD of four cultures from two independent experiments. Covariance analysis was used for the statistical comparison of linear regression curves (left panels).

Discussion

Activation of $\gamma\delta$ T cells during HCMV infection is documented in fetuses and in organ-transplanted patients where it involves minor subsets of V δ 2-negative lymphocytes. These cells can detect stress-induced antigens such as endothelial protein C receptor (EPCR) (Willcox et al., 2012) and this recognition involves a specific $\gamma\delta$ TCR. At present it is difficult to target these subsets for immunotherapeutic purposes. On the other hand V γ 9V δ 2 cells are abundant and prone to immunomanipulation by ABPs or phosphoantigens but there is no report of an alteration of V γ 9V δ 2 numbers or function in the course of HCMV infection. This goes along with our observations that V γ 9V δ 2 cells do not respond *in vitro* to HCMV-infected cells and seem to *ignore* HCMV. However, we show here that HCMV infection induces cellular perturbations which can be sensed by V γ 9V δ 2 cells when an additional TCR stimulus is provided.

Previous studies have shown that HCMV infection activates the transcription factor PPAR- γ (Rauwel et al., 2010), a transcription factor which also activates the expression of HMG-CoA synthetase and HMG-CoA reductase, the enzymes which control the initial steps of the mevalonate pathway (Iida et al., 2002). Upregulation of this pathway is possibly important to increase the availability of metabolites essential for the cycle of herpes viruses, such as geranyl-geranyl pyrophosphate (Blanc et al., 2011; Ye et al., 2003). The effect of HCMV on the endogenous production of phosphoantigens was however unpredictable as HCMV infection also induces an endogenous type 1-IFN response which has an opposite effect on this pathway (Blanc et al., 2011).

In our experiments, fibroblasts that have been treated with ABPs such as pamidronate or ZOL are more potent stimulators of cytokine release by V γ 9V δ 2 T cells when they are infected with HCMV and this infection increases the effect of ZOL by stimulating the accumulation of endogenous phosphoantigens IPP and Apppl. Except in the particular case of Daudi lymphoma, IPP and derived metabolites (Apppl, DMAPP, ApppD) are usually not detected in cells and this is because IPP is consumed in downstream metabolic reactions

(Gober et al., 2003; Jauhiainen et al., 2009; Vantourout et al., 2009). Similarly, we show here that it remains below the level of detection in HCMV-infected cells. Upregulation of phosphoantigens by HCMV is revealed when IPP is not consumed due to inhibition of farnesyl pyrophosphate synthase by ZOL. Strikingly, the accumulation of IPP/Apppl was high at 48h of infection and decreased thereafter. It is possible that activation of the type 1-IFN response is responsible for the decrease of IPP/Apppl at the late phase of infection. However, It is intriguing that the stimulatory activity of infected fibroblasts for lymphokine secretion increases further between 48 and 96 hours of infection. It is possible that a transient increase of intracellular phosphoantigens induces long-lasting effects in infected cells, involving for example butyrophilin 3A1 rearrangement (Harly et al., 2012). Nevertheless, additional mechanisms are not excluded and may involve expression of surface molecules or secretion of soluble factors by infected cells.

We show that V γ 9V δ 2 cells have the potential to limit HCMV replication when they are in co-culture with infected fibroblasts. V γ 9V δ 2 cells have a potent anti-tumor activity which is mainly due to their cytolytic potential and is controlled by NKG2D and other NK receptors (Nedellec et al., 2010). Our V γ 9V δ 2 cell lines are also cytotoxic in *in vitro* assays on fibroblasts treated with ZOL at doses above 0.4 μ M, but strikingly, infection of fibroblasts with HCMV progressively decreased their sensitivity to lysis during the first 48h, possibly due to multiple escape mechanisms involving NKG2D ligands. Thus the main mechanism which allows the control of HCMV amplification in co-cultures is probably not a preferential cytolytic activity on HCMV-infected targets. Our results also suggest that escape mechanisms have a distinct impact on cytotoxicity and stimulation of IFN- γ /TNF. HCMV infection may impact the expression of NKG2D ligands in our experiments and leads to resistance to V γ 9V δ 2 cytotoxicity. It has been shown however, in the case of V γ 9V δ 2 T cells, that NKG2D regulation has a little effect on lymphokine secretion (Nedellec et al., 2010). Finally, blocking TNF or IFN- γ decreases strongly the anti-viral activity of V γ 9V δ 2 T cells, showing that these two cytokines

are important antiviral effectors in this system as well as for anti-HCMV CD4 cells (Davignon et al., 1996).

Usage of a synergy between ABPs and HCMV for targeting infected cells with V γ 9V δ 2 T cells requires preservation of non-infected cells; the relative safeness of ABP administration in the clinic even in the presence of IL-2 (Clezardin, 2011; Fournie et al., 2013) indicates that this is the case at therapeutic concentrations. However, the peak serum concentration of ZOL after therapeutic intervention is close or below 1 μ M (Belmant et al., 2006; Chen et al., 2002). As the setting used to demonstrate the synergistic effect on lymphokine secretion resulted in unwanted cytotoxicity on non-infected cells, we evaluated an experimental setting where ABPs were maintained at low concentration. ZOL had no detrimental effect on the uninfected cells even the presence of $\gamma\delta$ cells although it allowed to inhibition of virion release by infected cells by more than 3 logs in the presence of V γ 9V δ 2 cells. Interestingly, in the absence of $\gamma\delta$ cells, the same concentrations produced a slight inhibition of viral replication (about one log), possibly because optimal viral replication requires downstream mevalonate pathway metabolites (Ye et al., 2003) and thus ABPs could be beneficial to control HCMV replication through a dual effect at clinically relevant concentrations.

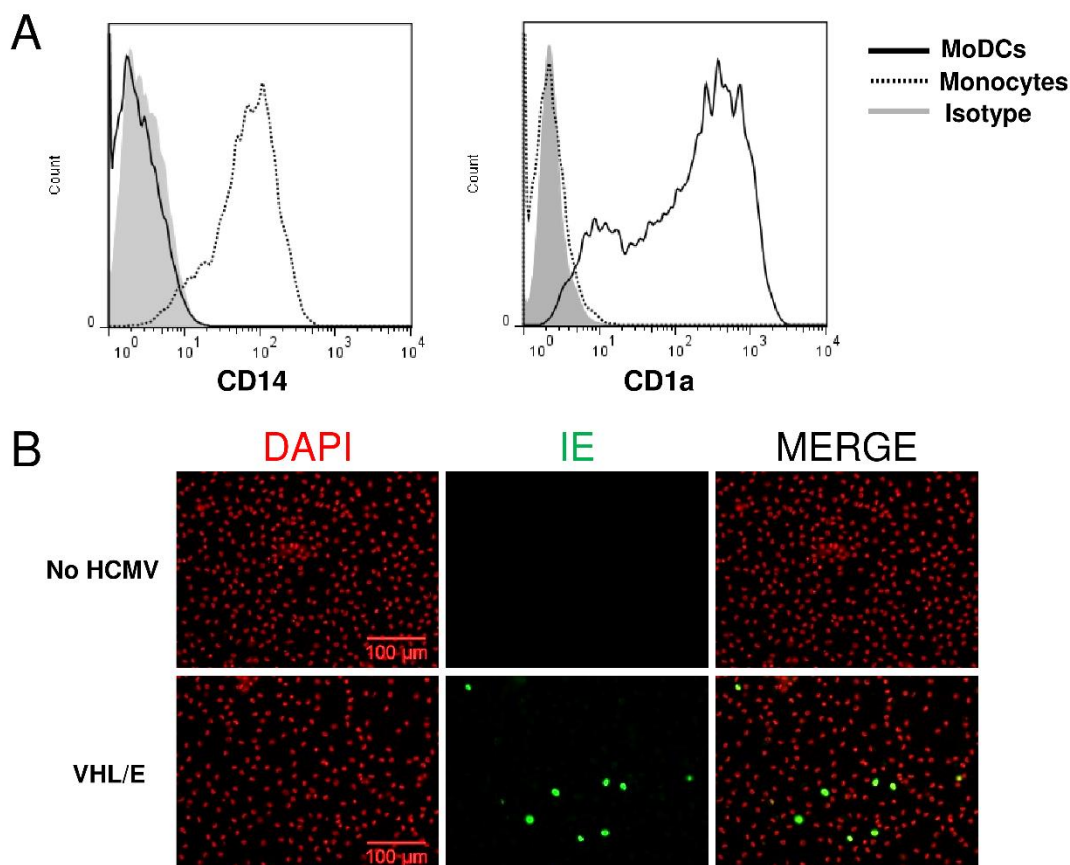
Based on these *in vitro* experiments, it will be important to evaluate the effect of ABPs *in vivo*, in a primate infection model for example which would combine permissiveness for HCMV, presence of phosphoantigen-responsive cells and expression of species-restricted molecules such as BTN3A1. Such a model would allow investigating whether targeting V γ 9V δ 2 T cells with ABPs is useful and safe for controlling infection on the long term or for controlling viral reactivation from latent reservoirs, which is still a challenging issue in the context of transplantation for example.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Franck Halary, Martin Messerle and Christian Sinzger for kindly providing HCMV strains. We thank Fatima-Ezzahra L'Faqihi-Olive, Valérie Duplan-Eche, Anne-Laure

Iscache (cytometry platform of CPTP), Sophie Allard and Astrid Canivet (imagery platform of CPTP) for their expert assistance.

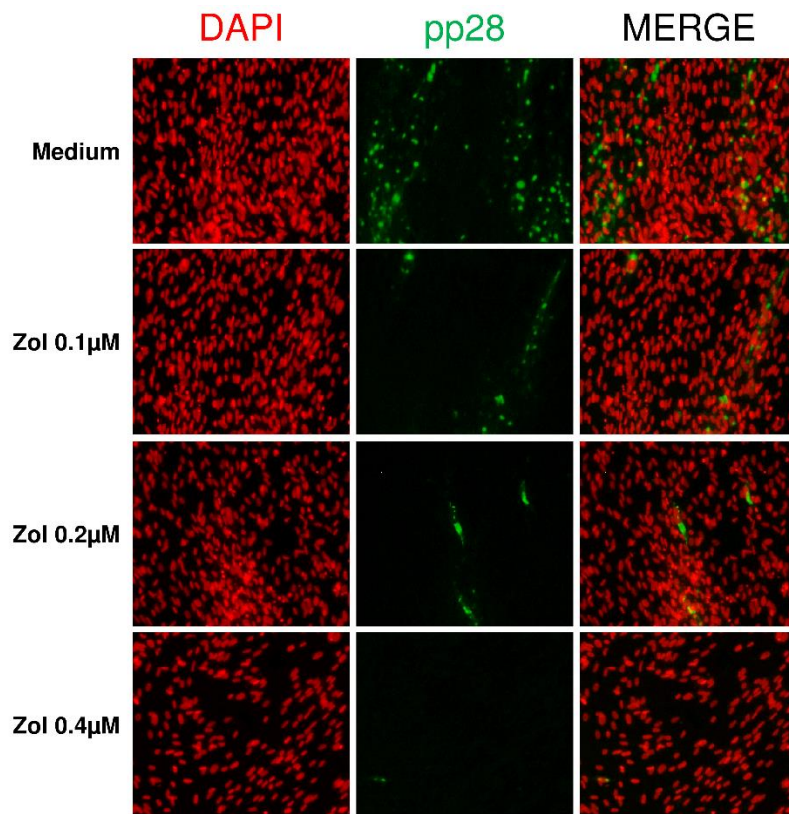
SUPPLEMENTAL FIGURES



Supplemental figure 1: Differentiation and permissiveness of DC for HCMV

Monocyte-derived dendritic cells (DC) were generated as described in (Ref). In brief, CD14+ cells were purified from PBMC by positive magnetic sorting (Miltenyi Biotec kit) and put to differentiate in CM-FCS containing IL-4 and GM-CSF (Miltenyi Biotec, 50ng/ml and 20ng/ml respectively) for 5 days. **(A)** Histograms show surface staining of sorted monocytes at the start of culture (mono) and after differentiation (DC) with anti-CD14-FITC and CD1a-FITC (BD Biosciences). **(B)** DCs were infected with HCMV-VHL/E (MOI=5) at day 5 post-differentiation induction. Cells were stained after 72h of infection with anti-HCMV-IE antibody and DAPI to check for permissiveness for HCMV.

(Ref): Carlier, J., H. Martin, B. Mariame, B. Rauwel, C. Mengelle, H. Weclawiak, A. Coaquette, C. Vauchy, P. Rohrlich, N. Kamar, L. Rostaing, G. Herbein, and C. Davrinche. 2011. Paracrine inhibition of GM-CSF signaling by human cytomegalovirus in monocytes differentiating to dendritic cells. *Blood* 118: 6783-6792



Supplemental figure 2: Vγ9Vδ2 T cells limit expression of late HCMV antigen pp28

Representative images obtained in co-cultures of infected fibroblasts with γδ cells, in the absence (no stim) or presence of increasing doses of zoledronate (Zol): MRC-5 cells were cultured in medium containing Zol at the indicated concentration and infected or not with HCMV (AD169, MOI=0.2) 3h before addition of a Vγ9Vδ2 T cell line (lymphocyte:fibroblast ratio of 0.2:1). Zol was maintained in the medium throughout 6 days of co-culture. Non-adherent cells were then removed; the adherent fibroblast layer was fixed, stained with anti-HCMV-pp28 antibodies (FITC, green) and DAPI (red), and analyzed by wide field fluorescence microscopy for nuclear staining.

REFERENCES

1. Eberl, M., M. Hintz, A. Reichenberg, A. K. Kollas, J. Wiesner, and H. Jomaa. 2003. Microbial isoprenoid biosynthesis and human gammadelta T cell activation. *FEBS Lett* 544: 4-10.
2. Tanaka, Y., C. T. Morita, Y. Tanaka, E. Nieves, M. B. Brenner, and B. R. Bloom. 1995. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature* 375: 155-158.
3. Thompson, K., J. E. Dunford, F. H. Ebetino, and M. J. Rogers. 2002. Identification of a bisphosphonate that inhibits isopentenyl diphosphate isomerase and farnesyl diphosphate synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 869-873.
4. Gober, H. J., M. Kistowska, L. Angman, P. Jenö, L. Mori, and G. De Libero. 2003. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med* 197: 163-168.
5. Kobayashi, H., and Y. Tanaka. 2015. gammadelta T Cell Immunotherapy-A Review. *Pharmaceuticals* 8: 40-61.
6. Poccia, F., C. Gioia, F. Martini, A. Sacchi, P. Piacentini, M. Tempestilli, C. Agrati, A. Amendola, A. Abdeddaim, C. Vlassi, M. Malkovsky, and G. D'Offizi. 2009. Zoledronic acid and interleukin-2 treatment improves immunocompetence in HIV-infected persons by activating Fatima-Ezzahra L'Faqihi-Olive Valérie Duplan-Eche Anne-Laure Iscache Vgamma9Vdelta2 T cells. *AIDS* 23: 555-565.
7. Harly, C., C. M. Peigne, and E. Scotet. 2014. Molecules and Mechanisms Implicated in the Peculiar Antigenic Activation Process of Human Vgamma9Vdelta2 T Cells. *Front Immunol* 5: 657.
8. Chien, Y. H., C. Meyer, and M. Bonneville. 2014. gammadelta T Cells: First Line of Defense and Beyond. *Ann Rev Immunol*.

9. Dimova, T., M. Brouwer, F. Gosselin, J. Tassignon, O. Leo, C. Donner, A. Marchant, and D. Vermijlen. 2015. Effector Vgamma9Vdelta2 T cells dominate the human fetal gammadelta T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
10. Sandstrom, A., L. Scharf, G. McRae, A. J. Hawk, S. C. Meredith, and E. J. Adams. 2012. gammadelta T cell receptors recognize the non-classical major histocompatibility complex (MHC) molecule T22 via conserved anchor residues in a MHC peptide-like fashion. *J Biol Chem* 287: 6035-6043.
11. Vavassori, S., A. Kumar, G. S. Wan, G. S. Ramanjaneyulu, M. Cavallari, S. El Daker, T. Beddoe, A. Theodossis, N. K. Williams, E. Gostick, D. A. Price, D. U. Soudamini, K. K. Voon, M. Olivo, J. Rossjohn, L. Mori, and G. De Libero. 2013. Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human gammadelta T cells. *Nat Immunol* 14: 908-916.
12. Wang, H., O. Henry, M. D. Distefano, Y. C. Wang, J. Raikonen, J. Monkkonen, Y. Tanaka, and C. T. Morita. 2013. Butyrophilin 3A1 plays an essential role in prenyl pyrophosphate stimulation of human Vgamma2Vdelta2 T cells. *J Immunol* 191: 1029-1042.
13. Rhodes, D. A., H. C. Chen, A. J. Price, A. H. Keeble, M. S. Davey, L. C. James, M. Eberl, and J. Trowsdale. 2015. Activation of Human gammadelta T Cells by Cytosolic Interactions of BTN3A1 with Soluble Phosphoantigens and the Cytoskeletal Adaptor Periplakin. *J Immunol* 194: 2390-96
14. Scotet, E., L. O. Martinez, E. Grant, R. Barbaras, P. Jenot, M. Guiraud, B. Monsarrat, X. Saulquin, S. Maillet, J. P. Esteve, F. Lopez, B. Perret, X. Collet, M. Bonneville, and E. Champagne. 2005. Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity* 22: 71-80.
15. Lafarge, X., P. Merville, M. C. Cazin, F. Berge, L. Potaux, J. F. Moreau, and J. Dechanet-Merville. 2001. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves

- when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis* 184: 533-541.
16. Agrati, C., G. D'Offizi, M. L. Gougeon, M. Malkovsky, A. Sacchi, R. Casetti, V. Bordoni, E. Cimini, and F. Martini. 2011. Innate Gamma/Delta T-Cells during HIV Infection: Terra Relatively Incognita in Novel Vaccination Strategies? *AIDS Rev* 13: 3-12.
 17. Cummings, J. S., C. Cairo, C. Armstrong, C. E. Davis, and C. D. Pauza. 2008. Impacts of HIV infection on Vgamma2Vdelta2 T cell phenotype and function: a mechanism for reduced tumor immunity in AIDS. *J Leuk Biol* 84: 371-379.
 18. Cimini, E., C. Bonnafous, V. Bordoni, E. Lalle, H. Sicard, A. Sacchi, G. Berno, C. Gioia, G. D'Offizi, U. Visco Comandini, C. Vlassi, M. R. Capobianchi, F. Martini, and C. Agrati. 2012. Interferon-alpha Improves Phosphoantigen-Induced Vgamma9Vdelta2 T-Cells Interferon-gamma Production during Chronic HCV Infection. *PLoS One* 7: e37014.
 19. Cimini, E., C. Bonnafous, H. Sicard, C. Vlassi, G. D'Offizi, M. R. Capobianchi, F. Martini, and C. Agrati. 2013. In vivo interferon-alpha/ribavirin treatment modulates Vgamma9Vdelta2 T-cell function during chronic HCV infection. *J Interferon Cytokine Res* 33: 136-141.
 20. Tu, W., J. Zheng, Y. Liu, S. F. Sia, M. Liu, G. Qin, I. H. Ng, Z. Xiang, K. T. Lam, J. S. Peiris, and Y. L. Lau. 2011. The aminobisphosphonate pamidronate controls influenza pathogenesis by expanding a gammadelta T cell population in humanized mice. *J Exp Med* 208: 1511-1522.
 21. Lucin, P., H. Mahmutefendic, G. Blagojevic Zagorac, and M. Ilic Tomas. 2015. Cytomegalovirus immune evasion by perturbation of endosomal trafficking. *Cell Mol Immunol* 12: 154-169.
 22. Fielding, C. A., R. Aicheler, R. J. Stanton, E. C. Wang, S. Han, S. Seirafian, J. Davies, B. P. McSharry, M. P. Weekes, P. R. Antrobus, V. Prod'homme, F. P. Blanchet, D. Sugrue, S. Cuff, D. Roberts, A. J. Davison, P. J. Lehner, G. W. Wilkinson, and P. Tomasec. 2014. Two Novel Human Cytomegalovirus NK Cell Evasion Functions Target MICA for Lysosomal Degradation. *PLoS Pathog* 10: e1004058.

23. Halenius, A., C. Gerke, and H. Hengel. 2015. Classical and non-classical MHC I molecule manipulation by human cytomegalovirus: so many targets-but how many arrows in the quiver? *Cell Mol Immunol* 12: 139-153.
24. Carlier, J., H. Martin, B. Mariame, B. Rauwel, C. Mengelle, H. Weclawiak, A. Coaquette, C. Vauchy, P. Rohrllich, N. Kamar, L. Rostaing, G. Herbein, and C. Davrinche. 2011. Paracrine inhibition of GM-CSF signaling by human cytomegalovirus in monocytes differentiating to dendritic cells. *Blood* 118: 6783-6792.
25. Wu, L., M. R. Mashego, J. C. van Dam, A. M. Proell, J. L. Vinke, C. Ras, W. A. van Winden, W. M. van Gulik, and J. J. Heijnen. 2005. Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass spectrometry using uniformly ¹³C-labeled cell extracts as internal standards. *Anal Biochem* 336: 164-171.
26. Fortunato, E. A., A. K. McElroy, I. Sanchez, and D. H. Spector. 2000. Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends Microbiol* 8: 111-119.
27. Harly, C., Y. Guillaume, S. Nedellec, C. M. Peigne, H. Monkkonen, J. Monkkonen, J. Li, J. Kuball, E. J. Adams, S. Netzer, J. Dechanet-Merville, A. Leger, T. Herrmann, R. Breathnach, D. Olive, M. Bonneville, and E. Scotet. 2012. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human gammadelta T-cell subset. *Blood* 120: 2269-2279.
28. Nussbaumer, O., G. Gruenbacher, H. Gander, and M. Thurnher. 2011. DC-like cell-dependent activation of human natural killer cells by the bisphosphonate ZOLedronic acid is regulated by gammadelta T lymphocytes. *Blood* 118: 2743-2751.
29. Schmidt, A., S. J. Rutledge, N. Endo, E. E. Opas, H. Tanaka, G. Wesolowski, C. T. Leu, Z. Huang, C. Ramachandaran, S. B. Rodan, and G. A. Rodan. 1996. Protein-tyrosine phosphatase activity regulates osteoclast formation and function: inhibition by alendronate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3068-3073.

30. Skorey, K., H. D. Ly, J. Kelly, M. Hammond, C. Ramachandran, Z. Huang, M. J. Gresser, and Q. Wang. 1997. How does alendronate inhibit protein-tyrosine phosphatases? *J Biol Chem* 272: 22472-22480.
31. Jauhiainen, M., H. Monkkonen, J. Raikonen, J. Monkkonen, and S. Auriola. 2009. Analysis of endogenous ATP analogs and mevalonate pathway metabolites in cancer cell cultures using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr* 877: 2967-75.
32. Vantourout, P., and A. Hayday. 2013. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nat Rev. Immunol* 13: 88-100.
33. Cha, T. A., E. Tom, G. W. Kemble, G. M. Duke, E. S. Mocarski, and R. R. Spaete. 1996. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol* 70: 78-83.
34. Miyagawa, F., Y. Tanaka, S. Yamashita, and N. Minato. 2001. Essential requirement of antigen presentation by monocyte lineage cells for the activation of primary human gamma delta T cells by aminobisphosphonate antigen. *J Immunol* 166: 5508-5514.
35. Davignon, J. L., P. Castanie, J. A. Yorke, N. Gautier, D. Clement, and C. Davrinche. 1996. Anti-human cytomegalovirus activity of cytokines produced by CD4+ T-cell clones specifically activated by IE1 peptides in vitro. *J Virol* 70: 2162-2169.
36. Romero, R., and J. E. Lavine. 1996. Cytokine inhibition of the hepatitis B virus core promoter. *Hepatology* 23: 17-23.
37. Willcox, C. R., V. Pitard, S. Netzer, L. Couzi, M. Salim, T. Silberzahn, J. F. Moreau, A. C. Hayday, B. E. Willcox, and J. Dechanet-Merville. 2012. Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nat Immunol* 13: 872-879.
38. Rauwel, B., B. Mariame, H. Martin, R. Nielsen, S. Allart, B. Pipy, S. Mandrup, M. D. Devignes, D. Evain-Brion, T. Fournier, and C. Davrinche. 2010. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by human cytomegalovirus for de

- novo replication impairs migration and invasiveness of cytotrophoblasts from early placentas. *J Virol* 84: 2946-2954.
39. Iida, K. T., Y. Kawakami, H. Suzuki, H. Sone, H. Shimano, H. Toyoshima, Y. Okuda, and N. Yamada. 2002. PPAR gamma ligands, troglitazone and pioglitazone, up-regulate expression of HMG-CoA synthase and HMG-CoA reductase gene in THP-1 macrophages. *FEBS Lett* 520: 177-181.
 40. Ye, J., C. Wang, R. Sumpter, Jr., M. S. Brown, J. L. Goldstein, and M. Gale, Jr. 2003. Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc Nat Acad Sci U S A* 100: 15865-15870.
 41. Blanc, M., W. Y. Hsieh, K. A. Robertson, S. Watterson, G. Shui, P. Lacaze, M. Khondoker, P. Dickinson, G. Sing, S. Rodriguez-Martin, P. Phelan, T. Forster, B. Strobl, M. Muller, R. Riemersma, T. Osborne, M. R. Wenk, A. Angulo, and P. Ghazal. 2011. Host defense against viral infection involves interferon mediated down-regulation of sterol biosynthesis. *PLoS Biol* 9: e1000598.
 42. Vantourout, P., J. Mookerjee-Basu, C. Rolland, F. Pont, H. Martin, C. Davrinche, L. O. Martinez, B. Perret, X. Collet, C. Perigaud, S. Peyrottes, and E. Champagne. 2009. Specific requirements for Vgamma9Vdelta2 T cell stimulation by a natural adenylylated phosphoantigen. *J Immunol* 183: 3848-3857.
 43. Nedellec, S., C. Sabourin, M. Bonneville, and E. Scotet. 2010. NKG2D costimulates human V gamma 9V delta 2 T cell antitumor cytotoxicity through protein kinase C theta-dependent modulation of early TCR-induced calcium and transduction signals. *J Immunol* 185: 55-63.
 44. Clezardin, P. 2011. Bisphosphonates' antitumor activity: an unravelled side of a multifaceted drug class. *Bone* 48: 71-79.
 45. Fournie, J. J., H. Sicard, M. Poupot, C. Bezombes, A. Blanc, F. Romagne, L. Ysebaert, and G. Laurent. 2013. What lessons can be learned from gammadelta T cell-based cancer immunotherapy trials? *Cell Mol Immunol* 10: 35-41.

46. Chen, T., J. Berenson, R. Vescio, R. Swift, A. Gilchick, S. Goodin, P. LoRusso, P. Ma, C. Ravera, F. Deckert, H. Schran, J. Seaman, and A. Skerjanec. 2002. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. *J Clin Pharmacol* 42: 1228-1236.
47. Belmant, C., D. Decise, and J. J. Fournie. 2006. Phosphoantigens and aminobisphosphonates. New leads targeting gammadelta T lymphocytes for cancer immunotherapy. *Drug Discov Today* 3: 17-23.

FOOTNOTE

^a FUNDING

This work was supported by the *Fondation pour la Recherche Médicale*, grant DCM20121225761

Résultats supplémentaires

Dans ce manuscrit, nous avons précisé les mécanismes effecteurs des T V γ 9V δ 2 qui sont en jeu pour limiter l'infection. En effet, la sécrétion d'IFN- γ et de TNF semble essentielle, alors que la cytotoxicité ne semble pas être impliquée. Le deuxième objectif de ma thèse a eu pour but de préciser les mécanismes par lesquels le virus induit un stimulus aux T V γ 9V δ 2 en synergie avec le traitement par les ABP. Les résultats précédents montrent que l'infection par le HCMV induit une surproduction intracellulaire de P-Ags dans des cellules traitées par des ABP. Ceci pourrait s'expliquer par une modulation de la voie du MVA au cours de l'infection virale. Cependant, cette production apparaît maximale après 48h d'infection et diminue fortement à 96h d'infection. Par contre, la sécrétion de cytokines par les T V γ 9V δ 2 augmente avec le temps d'infection, jusqu'à 96h. Par conséquent, la surproduction de P-Ags suite à l'infection ne semble pas expliquer à elle seule l'activation des T V γ 9V δ 2. Le HCMV induirait au moins un autre co-stimulus aux T V γ 9V δ 2 après 48h d'infection. Plusieurs autres mécanismes peuvent être envisagés. Nous avons émis l'hypothèse que l'expression de la BTN3A1, molécule clé dans l'activation des T V γ 9V δ 2, pourrait être modulée par l'infection HCMV. Il est également possible que le HCMV induise un autre co-stimulus (membranaire ou soluble) indépendamment de la voie du MVA.

1. Rôle de la BTN3A1 dans l'activation des T V γ 9V δ 2 suite à une infection HCMV

Etant donné que la BTN3A1 a un rôle clé dans l'activation des T V γ 9V δ 2, nous avons voulu confirmer que cette molécule était néanmoins indispensable à la reconnaissance des cellules infectées par les T V γ 9V δ 2. En effet, nous ne pouvons pas exclure que le zolédronate induise dans les cellules infectées un stimulus activateur indépendant de l'axe BTN/P-Ags. Pour mettre en évidence le rôle possible de la BTN3A1, les fibroblastes MRC-5 infectées ou non par HCMV ont été préalablement traités avec l'anticorps antagoniste de la BTN3A1 (103.2). Les travaux de Harly et ses collaborateurs suggèrent en effet que cet anticorps inhibe la réactivité des T V γ 9V δ 2 en figeant la BTN3A1 dans une conformation non activatrice (Harly et al., 2012). Nous avons ensuite analysé l'activation de la production de cytokines par des T V γ 9V δ 2 mis en co-culture avec ces fibroblastes.

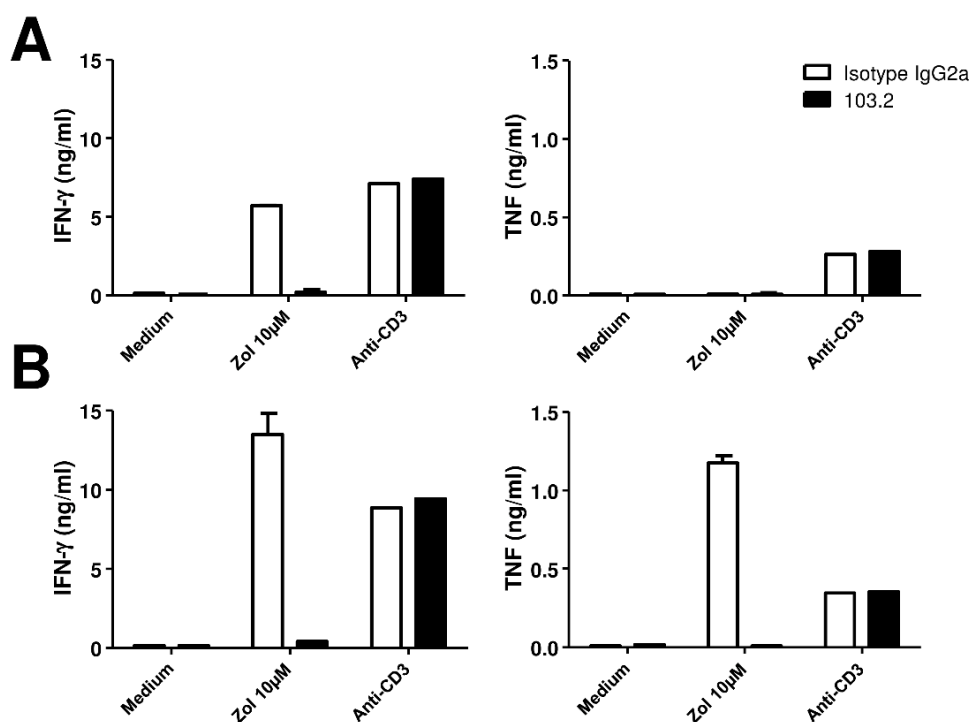


Figure 28 : Rôle de la BTN3A1 dans l'activation des T Vγ9Vδ2 suite à une infection HCMV.

Les cellules MRC-5 ont été ou non infectées pendant 48h (AD169 MOI=1) puis traitées par du zolédronate (Zol 10μM) les 16 dernières heures avant la co-culture avec les T Vγ9Vδ2 (rapport E/T : 1/1). 2h avant la co-culture, les fibroblastes MRC-5 non infectés (**A**) ou infectés 48h (**B**) ont été prétraités avec l'anticorps antagoniste de la BTN (103.2) ou IgG2a contrôle (10μg/ml) puis lavés. Dans certaines conditions, les lymphocytes ont été stimulés des anticorps anti-CD3 et des anticorps anti-Ig souris de chèvre (5μg/ml) au moment de la co-culture. Après 48h de co-culture, les surnageants ont été récupérés puis les cytokines IFN-γ et TNF ont été dosées par ELISA.

Dans notre système, en présence de fibroblastes MRC-5 traités par du zolédronate (10μM), nous observons que l'anticorps 103.2 abolit la sécrétion des cytokines IFN-γ et TNF par les T Vγ9Vδ2, ce qui n'est pas observé avec l'anticorps contrôle (IgG2a) (**Figure 28A**). En réponse à l'anticorps anti-CD3, la sécrétion des cytokines n'est pas inhibée en présence de l'antagoniste 103.2. Nous observons également un blocage similaire dans des co-cultures avec des cellules MRC-5 infectées par HCMV et traitées avec du zolédronate et l'anticorps 103.2 (**figure 28B**). Par conséquent, la BTN3A1 est essentielle dans la reconnaissance de cellules MRC-5 par les T Vγ9Vδ2 même dans le cas de l'infection par le HCMV.

Nous avons émis l'hypothèse que l'expression de la BTN3A1 pourrait être modulée par l'infection HCMV. Nous avons analysé le niveau d'expression de la BTN3A1 par cytométrie en flux à l'aide des anticorps 103.2 et 20.1 sur des fibroblastes MRC-5 infectés ou non par la souche AD169 du HCMV et traités ou non par du zolédronate (Zol). Ces 2 anticorps reconnaissent 2 épitopes différents sur le domaine extracellulaire de la BTN3A1.

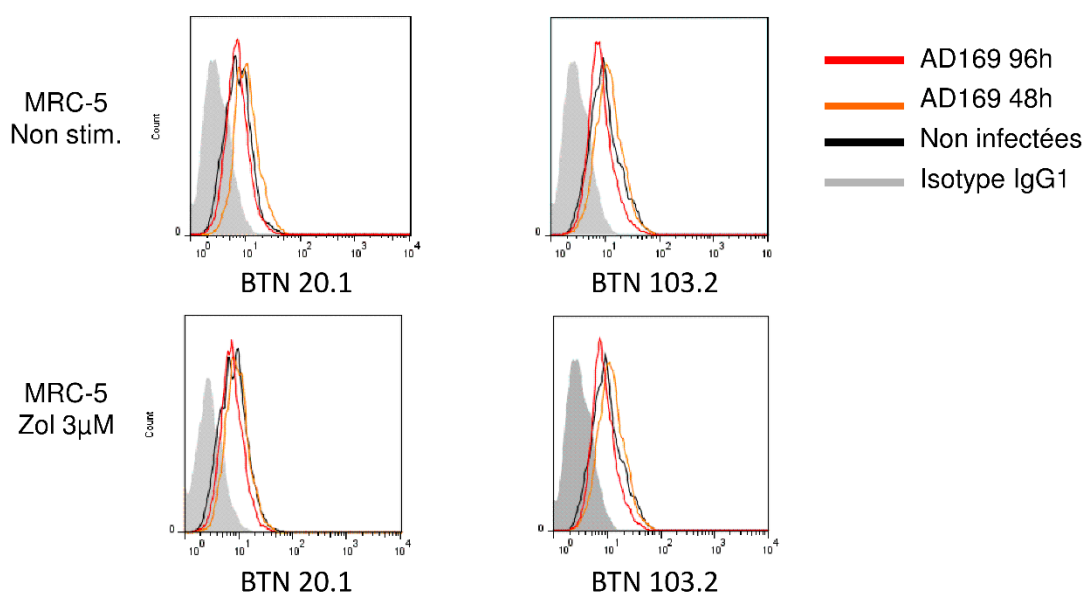


Figure 29 : Expression de la BTN3A1 sur des fibroblastes MRC-5 infectés par HCMV. Les cellules MRC-5 ont été infectées ou non (AD169, MOI=1) pendant différents temps (48-96h) puis traitées par du zolédronate (3µM) ou non (non stim.) les 16 dernières heures. Les cellules ont été décollées par du PBS 1mM EDTA. L'expression à la surface de la BTN3A1 a été analysée par cytométrie en flux après un marquage par deux types d'anticorps anti-BTN (BTN 20.1 et BTN 103.2) puis par un anticorps secondaire couplé PE.

Les expériences décrites dans la **figure 29** montrent que la BTN3A1 est exprimée à la surface des fibroblastes MRC-5 en absence d'infection et/ou de traitement par des ABP. L'infection par le HCMV pendant 48h ou 96h ne semble pas induire de modulation d'expression de la molécule BTN3A1 à la surface des cellules MRC-5. De plus, le traitement par des ABP ne semble pas non plus moduler de façon significative l'expression de cette protéine. Il reste toutefois possible que le virus induise un changement de conformation de la BTN3A1 qui ne serait pas détectable par ces anticorps en cytométrie en flux.

2. Rôle de la voie du mévalonate : Remplacement du zolédronate par de l'HDMAPP

Les résultats présents dans le manuscrit montrent également que l'infection par le HCMV entraîne une surproduction d'IPP et d'Apppl suite à un traitement au zolédronate. Plusieurs mécanismes peuvent être envisagés. D'une part, il est possible que le zolédronate soit davantage « capturé » par les cellules préalablement infectées par le HCMV. D'autre part, une autre hypothèse est que le HCMV pourrait moduler positivement la voie du MVA.

Afin de déterminer si le HCMV peut induire un autre co-stimulus indépendamment de la voie du MVA nous avons réalisé des co-cultures avec des fibroblastes MRC-5 préalablement chargés avec différentes concentrations d'un P-Ags « fort », le HDMAPP. L'activation des T Vγ9Vδ2 par le chargement en P-Ags des cellules cibles n'implique pas la voie du MVA contrairement au traitement par des ABP. Ainsi, nous avons voulu déterminer si le chargement en HDMAPP *in vitro* des cellules cibles infectées par HCMV induit également une activation des T Vγ9Vδ2.

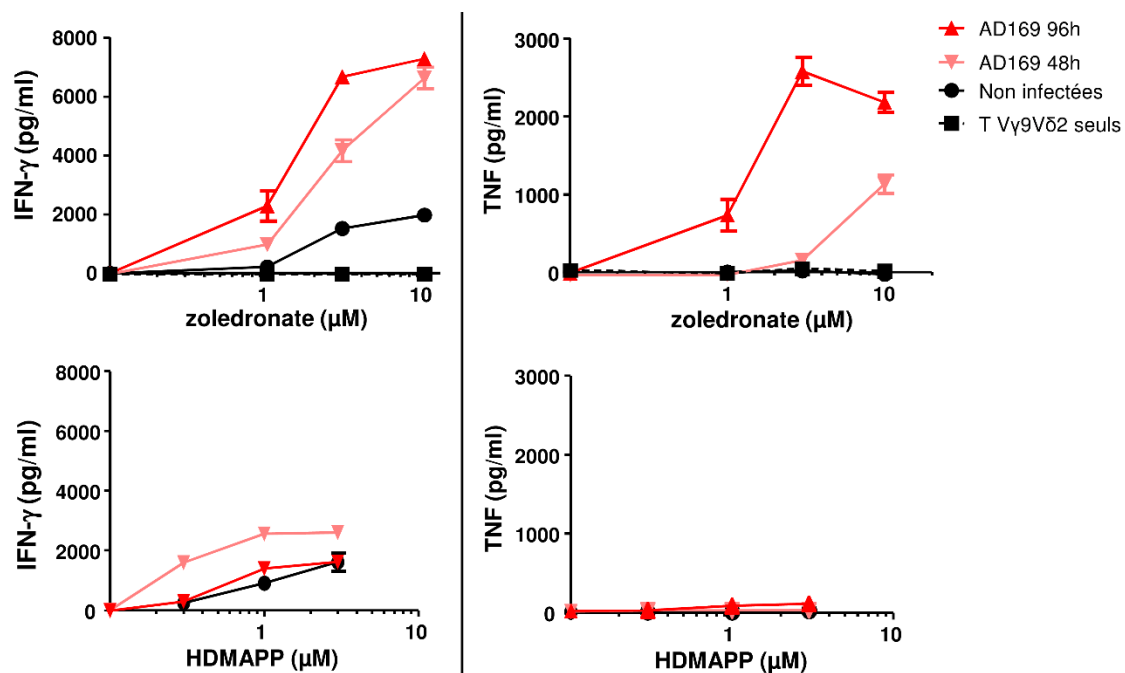


Figure 30 : Sécrétion de cytokines par les T Vγ9Vδ2 en présence de cellules infectées et chargées en HDMAPP. Les fibroblastes MRC-5 ont été infectés (AD169, MOI=1) ou non pendant 48/96h, puis traités par du zolédronate ou du HDMAPP les 16 dernières heures avant la co-culture avec les T Vγ9Vδ2 culture (rapport E/T : 1/1). Après 48h de co-culture, les surnageants ont été récupérés puis les cytokines IFN-γ et TNF ont été dosées par ELISA.

D'après l'expérience décrite dans la **figure 30**, on retrouve une augmentation de la sécrétion d'IFN- γ lorsque les T V γ 9V δ 2 sont en présence de fibroblastes MRC-5 infectés et traités par du HDMAPP. A l'inverse du zolédronate, cette réponse est maximale au début de l'infection (48h). De plus, nous n'avons pas observé de stimulation de la production de TNF avec un traitement par du HDMAPP, même suite à une infection par le HCMV (contrairement à ce qui est obtenu en présence de zolédronate).

Par conséquent, lors d'une infection HCMV, l'activation des T V γ 9V δ 2 semble rester moins forte en présence d'un P-Ag dit « fort » tel que le HDMAPP, que celle obtenue suite à un traitement ABP.

Cette étude suggère que l'accumulation de P-Ags n'est pas seul responsable de la synergie ABP-HCMV mais qu'il existe un autre effet, non reproduit en présence d'HDMAPP, qui déclenche la production de TNF et est maximal à un temps d'infection tardif.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Nos travaux ont donc permis de mettre en évidence une action synergique entre les ABP et le HCMV sur l'activation des T V γ 9V δ 2. Après sensibilisation par des ABP *in vitro*, des cellules infectées sont fortement activatrices des T V γ 9V δ 2. De plus, ces lymphocytes présentent des propriétés antivirales car ils sont capables de limiter la réplication et la production virale par la sécrétion des cytokines IFN- γ et TNF. Enfin, nous avons également montré que l'infection par le HCMV entraîne une surproduction d'IPP et d'Apppl dans les cellules cibles traitées aux ABP, ce qui explique en partie l'augmentation de la sécrétion de cytokines par ces lymphocytes. En conclusion, cette étude ouvre de nouvelles perspectives quant à une application thérapeutique des ABP dans le cadre d'une infection par le HCMV. De plus, poursuivre des études sur l'identification du ou des mécanisme(s) employé(s) par le virus sur l'activation des T V γ 9V δ 2 permettrait une meilleure compréhension du potentiel antiviral de ces lymphocytes.

Différentes souches virales HCMV et différents types cellulaires : conséquences sur l'activation des T V γ 9V δ 2

Nos résultats montrent une action synergique entre les ABP et le HCMV pour induire une sécrétion de cytokines par les T V γ 9V δ 2 *in vitro*. Cependant, cette sécrétion varie en fonction du type cellulaire infecté et de la souche virale utilisée. En effet, alors que la souche virale de laboratoire AD169 et les souches cliniques VHL/E et CON induisent toujours une augmentation de la sécrétion d'IFN- γ et de TNF en synergie avec le traitement ABP, l'infection par la souche TB40 n'entraîne pas de sécrétion de TNF. Cette observation pourrait s'expliquer par des délétions génomiques existantes dans certaines de ces souches, en particulier les souches de laboratoire (Wilkinson et al., 2015). De plus, la souche TB40 semble avoir un cycle réplcatif plus long que les autres souches que nous avons utilisées (supérieur à 5 jours dans les fibroblastes MRC-5).

La majorité des expériences réalisées ont été faites à partir de culture de fibroblastes MRC-5. Ces fibroblastes ont l'avantage de pouvoir être infectés facilement par différentes souches virales (AD169, VHL/E, TB40, CON et TRI). Cependant, lorsque nous avons analysé les réponses cytokiniques des T V γ 9V δ 2 avec d'autres types cellulaires, nous avons observé que ces réponses varient en fonction du type cellulaire infecté, en particulier en ce qui concerne la sécrétion du TNF. En effet, alors qu'avec des fibroblastes, l'infection en présence de traitement ABP entraîne un déclenchement de la sécrétion de TNF, on retrouve déjà un niveau basal de sécrétion de TNF suite au traitement ABP en absence d'infection avec des cellules d'astrocytome (U-373MG). Nous observons également peu de TNF en présence de cellules dendritiques dérivées de monocytes infectées. Il est possible que la sécrétion de TNF soit déclenchée par un co-stimulus membranaire absent sur les fibroblastes et les cellules

dendritiques mais présent constitutivement sur les cellules d'astrocytome. De plus, le virus pourrait induire l'expression de molécules impliquées dans ce co-stimulus dans les fibroblastes notamment. Ceci évoque la possibilité d'une expression de ligands de stress tels qu'ULBP/MIC dont l'expression peut être modulée par le HCMV (Welte et al., 2003). Par conséquent, des molécules membranaires pourraient être impliquées dans le phénomène observé, mais elles ne sont pas caractérisées à ce jour.

Conséquences du traitement ABP lors d'une infection par le HCMV

Nous avons observé que la co-culture avec des T Vγ9Vδ2 en présence d'un traitement ABP diminue le nombre de fibroblastes infectés, suggérant ainsi que ces lymphocytes limitent l'infection virale. Nos résultats ont permis de lier l'activité antivirale des T Vγ9Vδ2 à la production des cytokines IFN-γ et TNF et non pas à l'activité cytotoxique de ces cellules. Il est décrit que le HCMV peut empêcher la lyse des cellules infectées par des mécanismes anti-apoptotiques (Andoniou and Degli-Esposti, 2006). De plus, on peut également penser que les mécanismes d'échappement utilisés par le HCMV décrits pour échapper à la cytotoxicité des cellules NK pourraient être actifs vis-à-vis des T Vγ9Vδ2. Par exemple, le HCMV peut moduler l'expression de ligands du récepteur NKG2D, corécepteur clé impliqué dans l'activité cytotoxique, empêchant ainsi la lyse des cellules infectées (Rolle et al., 2003). Ce récepteur semble cependant peu impliqué dans l'activation de la sécrétion de cytokines, ce qui pourrait expliquer la différence entre l'augmentation de la sécrétion d'IFN-γ et de TNF et la diminution de l'activité cytotoxique après 48h d'infection en présence d'ABP.

L'IFN-γ et le TNF ont un rôle important dans l'inhibition de la réplication virale par les T Vγ9Vδ2. Ces cytokines, produites aussi par les T CD4+, sont en effet décrites pour leur activité antivirale depuis plusieurs années (Davignon et al., 1996). Cependant, il n'est pas exclu que la production d'autres molécules puissent être impliquée dans l'activité anti-HCMV des T Vγ9Vδ2.

Nous avons également observé que le traitement de cellules MRC-5 avec le zolédronate en absence de T Vγ9Vδ2 induit une légère diminution du nombre de cellules infectées après 6 jours de culture. Il est décrit que le HCMV a besoin de métabolites issus de la voie du MVA pour pouvoir se répliquer dans les cellules. En effet, le blocage par des statines de l'enzyme HMG-CoA réductase, qui agit au niveau des premières transformations de la voie du MVA, induit une inhibition de la réplication virale dans des cellules endothéliales ou des fibroblastes infectés *in vitro* (Ponroy et al., 2015; Potena et al., 2004). Il est donc possible que, le traitement zolédronate, en bloquant la voie du MVA en aval, entraîne une diminution la production de métabolites nécessaires à la réplication virale, tout comme le traitement par les

statines. Par conséquent dans nos co-cultures, la diminution du nombre de cellules infectées est la conséquence de deux phénomènes : une diminution de la réplication virale par le traitement zolédronate seul et une forte accentuation de cette diminution en présence des T V γ 9V δ 2.

Quels sont le ou les signaux induits par l'infection HCMV, en synergie avec le traitement ABP, qui sont nécessaires à l'activation des T V γ 9V δ 2 ?

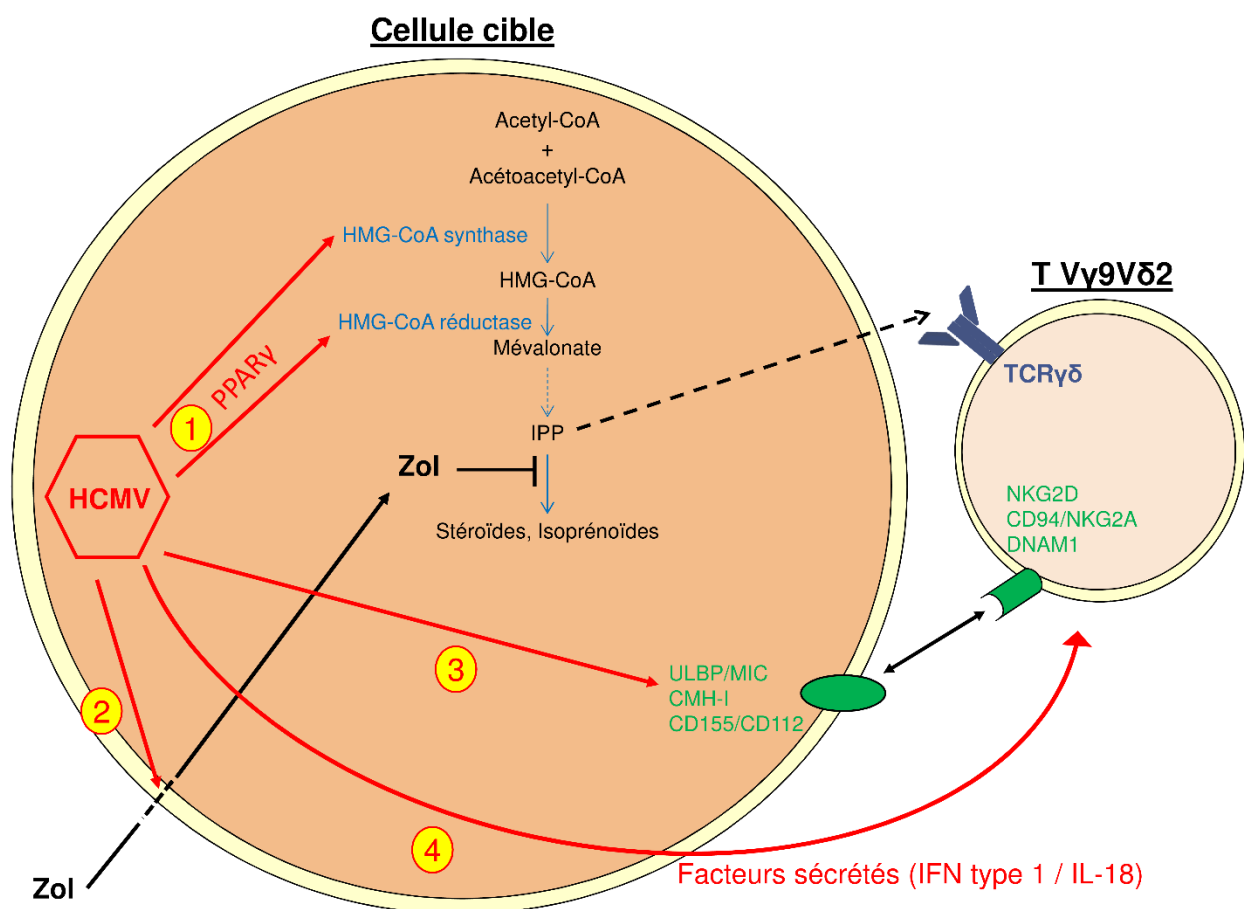


Figure 31 : Quels sont le ou les signaux induits par l'infection HCMV, en synergie avec le traitement ABP, qui sont nécessaires à l'activation des T V γ 9V δ 2 ? Le HCMV pourrait activer la voie du MVA (enzymes HMG-CoA synthase et reductase) via PPAR γ (1). Il est également possible que le zolédronate soit davantage « capturé » par les cellules préalablement infectées par le HCMV (2). Le HCMV est capable de moduler des ligands des NKR (ULBP/MIC, CMH-I, CD155/CD112) (3). Il est aussi possible que les cellules infectées produisent des facteurs (IFN type 1 ou IL-18) (4).

- *Le HCMV pourrait moduler la voie du MVA ?*

Nous avons observé que l'infection par le HCMV entraîne une surproduction d'IPP et d'Apppl dans les cellules cibles traitées par des ABP. Comment le HCMV peut-il induire cette surproduction de P-Ags lors d'un traitement ABP ? Des données de la littérature suggèrent que le HCMV est capable de moduler la voie du MVA. En effet, la réponse IFN de type 1 induite lors d'une infection par MCMV peut entraîner une inhibition de cette voie (Blanc et al., 2011). A l'inverse, l'expression de gènes précoces du HCMV peut induire l'expression du facteur de transcription PPAR- γ (Rauwel et al., 2010), et il a été montré par ailleurs que ce facteur de transcription peut activer la voie du MVA. En effet, des travaux indiquent que PPAR- γ et ses ligands agonistes induisent une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans cette voie de biosynthèse du cholestérol, en particulier HMG-CoA synthase et réductase (Iida et al., 2002). Cependant, à l'heure actuelle, aucune étude n'a permis de mettre en évidence un lien entre l'infection par HCMV et l'augmentation de la voie du MVA. Nous sommes actuellement en train de quantifier les ARNm des enzymes HMG-CoA réductase et synthase dans des fibroblastes infectés afin de déterminer si le HCMV est capable de moduler cette voie. Par la suite, il serait intéressant de bloquer PPAR- γ dans ces cellules infectées afin de définir si le HCMV module la voie du MVA via l'expression de ce facteur de transcription.

- *L'infection rend la capture du zolédronate plus élevée dans les cellules ?*

Il est également possible que la capture du zolédronate soit augmentée dans les cellules préalablement infectées par le HCMV. Ceci aurait pour conséquence directe un blocage plus important de la FPPS dans les cellules infectées et donc une surproduction de P-Ags. Nous allons tester cette hypothèse en utilisant du zolédronate couplé à un fluorochrome (CFSE), ce qui permettra de quantifier sa présence intracellulaire par cytométrie en flux dans des fibroblastes infectés.

Nous avons observé une augmentation de la production de P-Ags à 48h d'infection, suivie d'une diminution de cette surproduction dans les cellules infectées pendant 96h. Etant donné que la sécrétion de cytokines par les T V γ 9V δ 2 augmente avec le temps d'infection des cellules cibles entre 48 et 96h, ce phénomène de surproduction de P-Ags par les cellules infectées ne semble pas complètement expliquer l'activation des T V γ 9V δ 2. Un autre co-stimulus induit par le HCMV pourrait permettre l'activation des lymphocytes entre 48 et 96h d'infection.

- *Le HCMV induit un co-stimulus membranaire ?*

Nous avons observé que la protéine BTN3A1 est essentielle dans la reconnaissance des cellules MRC-5 par les T V γ 9V δ 2. Cependant celle-ci semble être impliquée aussi bien

dans la reconnaissance de cellules infectées que non infectées. De plus, il est connu que le HCMV est capable de moduler l'expression de certains ligands des récepteurs NKR tels que le CMH-I reconnu par CD94/NKG2A et ILT2, CD155 et CD112 reconnus par le récepteur activateur DNAM-1 (Noriega et al., 2012; Rolle et al., 2003; Stern-Ginossar et al., 2007; Tomasec et al., 2005). L'activation des T V γ 9V δ 2 en présence de cellules infectées par le HCMV pourrait donc impliquer la stimulation de ces NKR. Il serait intéressant d'inhiber l'interaction entre ces NKR exprimés par les T V γ 9V δ 2 et leurs ligands potentiellement exprimés par les cellules infectées à l'aide d'anticorps antagonistes afin de voir si cela interfère avec la réponse cytokinique des T V γ 9V δ 2.

- *Le HCMV induit un co-stimulus soluble ?*

Il est également possible que ce co-stimulus passe par une sécrétion, suite à l'infection par HCMV, d'une ou de(s) molécule(s) activatrice(s) pour les T V γ 9V δ 2. Par exemple, on pourrait imaginer que la production d'IFN de type I par les cellules infectées soit impliquée dans l'activation des T V γ 9V δ 2. En effet, il a été montré que la réponse antivirale cytokinique des T V γ 9V δ 2 face à des cellules dendritiques infectées par le virus de la Dengue dépend de la présence d'IFN de type I (reconnu par des récepteurs IFNAR exprimés à la surface des lymphocytes) (Tsai et al., 2015). Les IFN de type I sont aussi impliqués dans l'activité cytotoxique des T V γ 9V δ 2 face à des cellules leucémiques (Watanabe et al., 2006). De plus, il a été récemment décrit que la cytokine IL-18 est impliquée dans l'expansion des T V γ 9V δ 2 et leur production de cytokines suite à une stimulation par un traitement zolédronate des cellules cibles (Nussbaumer et al., 2013). En effet, en provoquant une diminution de métabolites prényl pyrophosphates, le zolédronate induit une activation de l'inflammasome, un complexe protéique contenant la caspase 1 à l'origine du clivage de la pro-IL-18 en IL-18 (forme active sécrétée). De façon intéressante, il a été également publié récemment que des cellules infectées par HCMV peuvent produire de l'IL-18 (Guerville et al., 2015). Il serait donc intéressant de déterminer l'implication de cette cytokine dans notre étude en analysant sa sécrétion par les fibroblastes infectés et en bloquant sa fonction dans les co-cultures avec les T V γ 9V δ 2 par des anticorps neutralisants.

Nous avons constaté que l'administration de P-Ags dits « fort » tel que le HDMAPP sur des cellules infectées n'induit pas une sécrétion de cytokines par les T V γ 9V δ 2 aussi élevée qu'en présence de zolédronate. Ceci peut être dû à un problème technique de chargement ou de stabilité *in vitro* des P-Ags solubles utilisés sur les fibroblastes. Il est également possible que le zolédronate induise un autre stimulus, non retrouvé en présence d'HDMAPP, qui agit en synergie avec le HCMV. Par exemple, l'activation de l'inflammasome par le zolédronate et le HCMV pourrait être nécessaire pour activer la sécrétion d'IFN- γ et de TNF par les T V γ 9V δ 2 en présence de cellules infectées.

Perspectives à long terme :

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 : une cible d'immunothérapie intéressante

Le HCMV est responsable de complications sévères chez des individus immunodéprimés. Malgré des traitements antiviraux existant pour limiter l'infection, ceux-ci sont parfois peu efficaces ce qui peut compliquer la guérison du patient. Ces traitements antiviraux peuvent être toxiques chez des patients transplantés de rein. De plus, le virus persiste sous forme latente tout au long de la vie de l'individu ce qui rend son éradication impossible à ce jour. Ces complications dues à l'infection chez les individus transplantés sont liées à l'état d'affaiblissement du système immunitaire qui n'est plus capable de limiter l'infection, comme c'est le cas chez un individu en bonne santé. Par conséquent, il serait intéressant d'essayer de rétablir une immunité efficace contre le HCMV chez ces patients. Dans ce sens, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 apparaissent comme étant une cible d'immunothérapie intéressante pour plusieurs raisons.

Premièrement, ces cellules sont relativement abondantes dans le sang (jusqu'à 10% des lymphocytes) et leur stimulation ne nécessite pas de sélection ou d'expansion clonale forte pour répondre de façon efficace à l'infection.

Deuxièmement, ces cellules ont des propriétés intéressantes face à une infection virale. En effet, elles sont capables de produire des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ qui est décrit comme pouvant inhiber la réplication du HCMV dans les cellules infectées (Davignon et al., 1996). De plus, ces lymphocytes sont capables d'avoir une activité cytotoxique rapide permettant de lyser des cellules tumorales ou infectées.

Troisièmement, les T V γ 9V δ 2 ont pour particularité de pouvoir être « immunomanipulés » par l'utilisation de P-Ags ou d'ABP. En effet, comme décrit dans l'introduction, des protocoles d'immunothérapie anticancéreuse sont en cours de mise au point chez l'Homme à partir de ces lymphocytes, de P-Ags ou d'ABP et d'IL-2 (Fournie et al., 2013). De plus, les ABP, qui sont actuellement utilisés pour traiter des maladies liées à une résorption osseuse, présentent une toxicité relativement faible aux doses utilisées, ce qui rend leur utilisation facilement envisageable.

Qu'en est-il d'un traitement ABP *in vivo* lors d'une infection ou réactivation du HCMV ?

Nos résultats ont permis de montrer un effet synergique entre l'infection par le HCMV et le traitement par des ABP afin de favoriser l'élimination du virus par les T V γ 9V δ 2. Ces résultats étant basés exclusivement sur des données issues de co-cultures de cellules

humaines, il serait intéressant d'évaluer le potentiel antiviral des T V γ 9V δ 2 lors d'une infection HCMV *in vivo*. Cependant, l'étude *in vivo* paraît difficile car les T V γ 9V δ 2 sont propres aux primates supérieurs et le HCMV n'est capable d'infecter que les cellules humaines. Ainsi, le modèle le plus approprié serait le macaque infecté par le cytomégalovirus puis traité par des ABP, sachant que l'infection par HCMV et une immuno-manipulation des T V γ 9V δ 2 ont déjà été réalisées sur ces animaux (Powers and Fruh, 2008; Sicard et al., 2005). Toutefois, un traitement ABP sur des macaques infectés par le HCMV n'a jamais été rapporté. Cela permettrait de caractériser l'effet des ABP sur la dissémination virale *in vivo*.

Afin de pallier aux problèmes liés à l'utilisation de macaques, il serait possible d'utiliser un modèle de souris humanisées. Un modèle *in vivo* de latence et de réactivation pour le HCMV a récemment été décrit dans des souris immunodéficientes NSG (NOD/-scid/IL-2R γ cnll), dépourvues de cellules B, T, NK et du système du complément, et dont le système immunitaire peut être en partie reconstitué avec des précurseurs hématopoïétiques humains CD34+ (Smith et al., 2010). Ces souris peuvent être infectées par le HCMV : le virus est retrouvé sous forme latente dans les précurseurs hématopoïétiques et peut être réactivé par des cytokines. La génération de lymphocytes T V γ 9V δ 2 dans ce système n'a pas été montrée et il est possible que les souris NSG reconstituées par des précurseurs hématopoïétiques humains ne développent pas naturellement de T V γ 9V δ 2. Néanmoins, elles ont été utilisées avec succès pour analyser les propriétés anti-tumorales des T V γ 9V δ 2 après reconstitution avec des T V γ 9V δ 2 humains matures préalablement cultivés *in vitro* (Devaud et al., 2009; Tu et al., 2011).

Il serait également intéressant de savoir si les patients sous traitement ABP font autant d'infections ou de réactivations virales HCMV que les patients sans traitement ABP. Les doses de zolédronate ayant montré une activité antivirale dans notre étude sont des concentrations thérapeutiques retrouvées chez les patients traités. En effet, après une administration de zolédronate, on retrouve généralement un pic de zolédronate à environ 1 μ M dans le sérum de ces patients (Chen et al., 2002). Est-ce que ces patients ont une rémission de pathologies associées au HCMV plus rapide lors d'un traitement ABP et cela est-il corrélé à une amplification de T V γ 9V δ 2 ? Il serait également intéressant d'étudier l'effet de ce traitement en présence d'IL-2, tels les protocoles étudiés actuellement en cancérologie (Kunzmann et al., 2000).

Il est actuellement impossible d'éradiquer le HCMV du fait que celui-ci puisse persister sous forme latente dans les cellules myéloïdes. Actuellement il n'existe pas de moyen de cibler et d'éliminer les cellules infectées de façon latente. Il serait intéressant de regarder si les T

V γ 9V δ 2 sont capables d'être activés en présence de cellules infectées de façon latente et traitées par des ABP. Il est peu probable que les cellules infectées de façon latente expriment une molécule co-stimulatrice des T V γ 9V δ 2 car l'expression des gènes du virus sous forme latente se limite à quelques transcrits spécifiques. Néanmoins, il n'est pas exclu que le HCMV soit capable de moduler la voie du MVA lors d'une infection latente. Si cela est le cas, on peut imaginer que le traitement par des ABP de cellules infectées de façon latente pourrait stimuler les T V γ 9V δ 2.

Le traitement ABP : nouvelles perspectives ?

Cette étude sur la synergie entre le traitement par les ABP et le HCMV permet aussi de poser la question : Est-ce que le traitement ABP pourrait agir en synergie avec d'autres virus que le HCMV, appartenant ou non à la famille des *Herpesviridae*? Nous avons vu dans l'introduction que les T V γ 9V δ 2 amplifiés avec des ABP (Pamidronate) *in vitro* sont capables de lyser spécifiquement des cellules transformées par EBV (Herpesvirus appartenant à la sous famille des *γ -herpesvirinae*) (Xiang et al., 2014). De plus, les auteurs ont démontré une activité antivirale des T V γ 9V δ 2 *in vivo* à partir de souris immunodéficientes et humanisées. Il serait donc intéressant de voir s'il existe une synergie entre les ABP et des virus appartenant aux différentes sous-familles α -, β - et *γ -herpesvirinae*. Est-ce que dans ce contexte les T V γ 9V δ 2 peuvent cibler spécifiquement les cellules infectées ?

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agrati, C., Alonzi, T., De Santis, R., Castilletti, C., Abbate, I., Capobianchi, M.R., D'Offizi, G., Siepi, F., Fimia, G.M., Tripodi, M., *et al.* (2006). Activation of Vgamma9Vdelta2 T cells by non-peptidic antigens induces the inhibition of subgenomic HCV replication. *International immunology* 18, 11-18.

Agrati, C., D'Offizi, G., Gougeon, M.L., Malkovsky, M., Sacchi, A., Casetti, R., Bordoni, V., Cimini, E., and Martini, F. (2011). Innate Gamma/Delta T-Cells during HIV Infection: Terra Relatively Incognita in Novel Vaccination Strategies? *AIDS Rev* 13, 3-12.

Ahn, K., Gruhler, A., Galocha, B., Jones, T.R., Wiertz, E.J., Ploegh, H.L., Peterson, P.A., Yang, Y., and Fruh, K. (1997). The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity* 6, 613-621.

Alejenef, A., Pachnio, A., Halawi, M., Christmas, S.E., Moss, P.A., and Khan, N. (2014). Cytomegalovirus drives Vdelta2neg gammadelta T cell inflation in many healthy virus carriers with increasing age. *Clinical and experimental immunology* 176, 418-428.

Allison, T.J., Winter, C.C., Fournie, J.J., Bonneville, M., and Garboczi, D.N. (2001). Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* 411, 820-824.

Andoniou, C.E., and Degli-Esposti, M.A. (2006). Insights into the mechanisms of CMV-mediated interference with cellular apoptosis. *Immunology and cell biology* 84, 99-106.

Angelini, D.F., Zambello, R., Galandini, R., Diamantini, A., Placido, R., Micucci, F., Poccia, F., Semenzato, G., Borsellino, G., Santoni, A., *et al.* (2011). NKG2A inhibits NKG2C effector functions of gammadelta T cells: implications in health and disease. *Journal of leukocyte biology* 89, 75-84.

Arnett, H.A., and Viney, J.L. (2014). Immune modulation by butyrophilins. *Nature reviews Immunology* 14, 559-569.

Arnon, T.I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., *et al.* (2005). Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nature immunology* 6, 515-523.

Atabani, S.F., Smith, C., Atkinson, C., Aldridge, R.W., Rodriguez-Peralvarez, M., Rolando, N., Harber, M., Jones, G., O'Riordan, A., Burroughs, A.K., *et al.* (2012). Cytomegalovirus replication kinetics in solid organ transplant recipients managed by preemptive therapy. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 12, 2457-2464.

Avdic, S., Cao, J.Z., Cheung, A.K., Abendroth, A., and Slobedman, B. (2011). Viral interleukin-10 expressed by human cytomegalovirus during the latent phase of infection modulates latently infected myeloid cell differentiation. *Journal of virology* 85, 7465-7471.

Barami, K. (2010). Oncomodulatory mechanisms of human cytomegalovirus in gliomas. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 17, 819-823.

Baryawno, N., Rahbar, A., Wolmer-Solberg, N., Taher, C., Odeberg, J., Darabi, A., Khan, Z., Sveinbjornsson, B., FuskevAg, O.M., Segerstrom, L., *et al.* (2011). Detection of human cytomegalovirus in medulloblastomas reveals a potential therapeutic target. *The Journal of clinical investigation* 121, 4043-4055.

Beck, S., and Barrell, B.G. (1988). Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. *Nature* 331, 269-272.

Beetz, S., Wesch, D., Marischen, L., Welte, S., Oberg, H.H., and Kabelitz, D. (2008). Innate immune functions of human gammadelta T cells. *Immunobiology* 213, 173-182.

Behr, C., Poupot, R., Peyrat, M.A., Poquet, Y., Constant, P., Dubois, P., Bonneville, M., and Fournie, J.J. (1996). Plasmodium falciparum stimuli for human gammadelta T cells are related to phosphorylated antigens of mycobacteria. *Infection and immunity* 64, 2892-2896.

Belmant, C., Decise, D., and Fournie, J.J. (2006). Phosphoantigens and aminobisphosphonates. New leads targeting gammadelta T lymphocytes for cancer immunotherapy. *Drug Discov Today* 3, 17-23.

Belmant, C., Espinosa, E., Poupot, R., Peyrat, M.A., Guiraud, M., Poquet, Y., Bonneville, M., and Fournie, J.J. (1999). 3-Formyl-1-butyl pyrophosphate A novel mycobacterial metabolite-activating human gammadelta T cells. *The Journal of biological chemistry* 274, 32079-32084.

Benzaid, I., Monkkonen, H., Bonnelye, E., Monkkonen, J., and Clezardin, P. (2012). In vivo phosphoantigen levels in bisphosphonate-treated human breast tumors trigger Vgamma9Vdelta2 T-cell antitumor cytotoxicity through ICAM-1 engagement. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18, 6249-6259.

Benzaid, I., Monkkonen, H., Stresing, V., Bonnelye, E., Green, J., Monkkonen, J., Touraine, J.L., and Clezardin, P. (2011). High phosphoantigen levels in bisphosphonate-treated human breast tumors promote Vgamma9Vdelta2 T-cell chemotaxis and cytotoxicity in vivo. *Cancer research* 71, 4562-4572.

Bergstresser, and Takashima (2001). Gamma-Delta T cells. *Chemical Immunology* 79, 100-102.

Biron, C.A., Byron, K.S., and Sullivan, J.L. (1989). Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *The New England journal of medicine* 320, 1731-1735.

Blanc, M., Hsieh, W.Y., Robertson, K.A., Watterson, S., Shui, G., Lacaze, P., Khondoker, M., Dickinson, P., Sing, G., Rodriguez-Martin, S., et al. (2011). Host defense against viral infection involves interferon mediated down-regulation of sterol biosynthesis. *PLoS biology* 9, e1000598.

Boeckh, M., and Geballe, A.P. (2011). Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *The Journal of clinical investigation* 121, 1673-1680.

Boehme, K.W., and Compton, T. (2004). Innate sensing of viruses by toll-like receptors. *Journal of virology* 78, 7867-7873.

Boehme, K.W., Guerrero, M., and Compton, T. (2006). Human Cytomegalovirus Envelope Glycoproteins B and H Are Necessary for TLR2 Activation in Permissive Cells. *The Journal of Immunology* 177, 7094-7102.

Boissier, S., Ferreras, M., Peyruchaud, O., Magnetto, S., Ebetino, F.H., Colombel, M., Delmas, P., Delaisse, J.M., and Clezardin, P. (2000). Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer research* 60, 2949-2954.

Boissier, S., Magnetto, S., Frappart, L., Cuzin, B., Ebetino, F.H., Delmas, P.D., and Clezardin, P. (1997). Bisphosphonates inhibit prostate and breast carcinoma cell adhesion to unmineralized and mineralized bone extracellular matrices. *Cancer research* 57, 3890-3894.

- Bonneville, M., and Fournie, J.J. (2005). Sensing cell stress and transformation through Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of the isoprenoid pathway metabolites. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 7, 503-509.
- Bonneville, M., O'Brien, R.L., and Born, W.K. (2010). Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nature reviews Immunology* 10, 467-478.
- Boyden, L.M., Lewis, J.M., Barbee, S.D., Bas, A., Girardi, M., Hayday, A.C., Tigelaar, R.E., and Lifton, R.P. (2008). Skint1, the prototype of a newly identified immunoglobulin superfamily gene cluster, positively selects epidermal gammadelta T cells. *Nature genetics* 40, 656-662.
- Bratcher, D.F., Bourne, N., Bravo, F.J., Schleiss, M.R., Slaoui, M., Myers, M.G., and Bernstein, D.I. (1995). Effect of passive antibody on congenital cytomegalovirus infection in guinea pigs. *The Journal of infectious diseases* 172, 944-950.
- Britt, W.J., and Boppana, S. (2004). Human cytomegalovirus virion proteins. *Human immunology* 65, 395-402.
- Brown, M.G., Dokun, A.O., Heusel, J.W., Smith, H.R., Beckman, D.L., Blattenberger, E.A., Dubbelde, C.E., Stone, L.R., Scalzo, A.A., and Yokoyama, W.M. (2001). Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* 292, 934-937.
- Bukowski, J.F., Morita, C.T., and Brenner, M.B. (1999). Human gamma delta T cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants, and tea: implications for innate immunity. *Immunity* 11, 57-65.
- Bukowski, J.F., Morita, C.T., Tanaka, Y., Bloom, B.R., Brenner, M.B., and Band, H. (1995). V gamma 2V delta 2 TCR-dependent recognition of non-peptide antigens and Daudi cells analyzed by TCR gene transfer. *Journal of immunology* 154, 998-1006.
- Bukowski, J.F., Warner, J.F., Dennert, G., and Welsh, R.M. (1985). Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 161, 40-52.
- Bukowski, J.F., Woda, B.A., Habu, S., Okumura, K., and Welsh, R.M. (1983). Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo. *Journal of immunology* 131, 1531-1538.
- Capietto, A.H., Martinet, L., and Fournie, J.J. (2011). Stimulated gammadelta T cells increase the in vivo efficacy of trastuzumab in HER-2+ breast cancer. *Journal of immunology* 187, 1031-1038.
- Caraglia, M., Santini, D., Marra, M., Vincenzi, B., Tonini, G., and Budillon, A. (2006). Emerging anti-cancer molecular mechanisms of aminobisphosphonates. *Endocrine-related cancer* 13, 7-26.
- Carding, S.R., and Egan, P.J. (2002). Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nature reviews Immunology* 2, 336-345.
- Carlier, J., Martin, H., Mariame, B., Rauwel, B., Mengelle, C., Weclawiak, H., Coaquette, A., Vauchy, C., Rohrich, P., Kamar, N., et al. (2011). Paracrine inhibition of GM-CSF signaling by human cytomegalovirus in monocytes differentiating to dendritic cells. *Blood* 118, 6783-6792.
- Carrillo-Bustamante, P., Kesmir, C., and de Boer, R.J. (2014). Quantifying the Protection of Activating and Inhibiting NK Cell Receptors during Infection with a CMV-Like Virus. *Frontiers in immunology* 5, 20.

Casetti, R., De Simone, G., Sacchi, A., Rinaldi, A., Viola, D., Agrati, C., Bordoni, V., Cimini, E., Tumino, N., Besi, F., *et al.* (2015). Vgamma9Vdelta2 T-Cell Polyfunctionality Is Differently Modulated in HAART-Treated HIV Patients according to CD4 T-Cell Count. *PLoS one* 10, e0132291.

Castella, B., Vitale, C., Coscia, M., and Massaia, M. (2011). Vgamma9Vdelta2 T cell-based immunotherapy in hematological malignancies: from bench to bedside. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68, 2419-2432.

Castro-Malaspina, H., Harris, R.E., Gajewski, J., Ramsay, N., Collins, R., Dharan, B., King, R., and Deeg, H.J. (2002). Unrelated donor marrow transplantation for myelodysplastic syndromes: outcome analysis in 510 transplants facilitated by the National Marrow Donor Program. *Blood* 99, 1943-1951.

Cavanaugh, V.J., Deng, Y., Birkenbach, M.P., Slater, J.S., and Campbell, A.E. (2003). Vigorous Innate and Virus-Specific Cytotoxic T-Lymphocyte Responses to Murine Cytomegalovirus in the Submaxillary Salivary Gland. *Journal of virology* 77, 1703-1717.

Cerboni, C., Mousavi-Jazi, M., Linde, A., Soderstrom, K., Brytting, M., Wahren, B., Karre, K., and Carbone, E. (2000). Human Cytomegalovirus Strain-Dependent Changes in NK Cell Recognition of Infected Fibroblasts. *The Journal of Immunology* 164, 4775-4782.

Cha, T.A., Tom, E., Kemble, G.W., Duke, G.M., Mocarski, E.S., and Spaete, R.R. (1996). Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol* 70, 78-83.

Chang, W.L., Baumgarth, N., Yu, D., and Barry, P.A. (2004). Human cytomegalovirus-encoded interleukin-10 homolog inhibits maturation of dendritic cells and alters their functionality. *Journal of virology* 78, 8720-8731.

Chapman, T.L., Heikeman, A.P., and Bjorkman, P.J. (1999). The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity* 11, 603-613.

Chee, M.S., Satchwell, S.C., Preddie, E., Weston, K.M., and Barrell, B.G. (1990). Human cytomegalovirus encodes three G protein-coupled receptor homologues. *Nature* 344, 774-777.

Chen, T., Berenson, J., Vescio, R., Swift, R., Gilchick, A., Goodin, S., LoRusso, P., Ma, P., Ravera, C., Deckert, F., *et al.* (2002). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. *Journal of clinical pharmacology* 42, 1228-1236.

Cheung, A.K., Gottlieb, D.J., Plachter, B., Pepperl-Klindworth, S., Avdic, S., Cunningham, A.L., Abendroth, A., and Slobedman, B. (2009). The role of the human cytomegalovirus UL111A gene in down-regulating CD4+ T-cell recognition of latently infected cells: implications for virus elimination during latency. *Blood* 114, 4128-4137.

Chien, Y.H., Iwashima, M., Kaplan, K.B., Elliott, J.F., and Davis, M.M. (1987). A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation. *Nature* 327, 677-682.

Chien, Y.H., Meyer, C., and Bonneville, M. (2014). gammadelta T Cells: First Line of Defense and Beyond. *Annual review of immunology*.

Cimini, E., Bonnafous, C., Bordoni, V., Lalle, E., Sicard, H., Sacchi, A., Berno, G., Gioia, C., D'Offizi, G., Visco Comandini, U., *et al.* (2012). Interferon-alpha Improves Phosphoantigen-

Induced Vgamma9Vdelta2 T-Cells Interferon-gamma Production during Chronic HCV Infection. *PLoS One* 7, e37014.

Cimini, E., Bonnafous, C., Sicard, H., Vlassi, C., D'Offizi, G., Capobianchi, M.R., Martini, F., and Agrati, C. (2013). In vivo interferon-alpha/ribavirin treatment modulates Vgamma9Vdelta2 T-cell function during chronic HCV infection. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 33, 136-141.

Clezardin, P. (2011). Bisphosphonates' antitumor activity: an unravelled side of a multifaceted drug class. *Bone* 48, 71-79.

Cobbs, C.S., Harkins, L., Samanta, M., Gillespie, G.Y., Bharara, S., King, P.H., Nabors, L.B., Cobbs, C.G., and Britt, W.J. (2002). Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer research* 62, 3347-3350.

Compton, T. (2004). Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends Cell Biol* 14, 5-8.

Compton, T., Nowlin, D.M., and Cooper, N.R. (1993). Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 193, 834-841.

Constant, P., Davodeau, F., Peyrat, M.A., Poquet, Y., Puzo, G., Bonneville, M., and Fournie, J.J. (1994). Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* 264, 267-270.

Coonrod, D., Collier, A.C., Ashley, R., DeRouen, T., and Corey, L. (1998). Association between cytomegalovirus seroconversion and upper genital tract infection among women attending a sexually transmitted disease clinic: a prospective study. *The Journal of infectious diseases* 177, 1188-1193.

Corvaisier, M., Moreau-Aubry, A., Diez, E., Bennouna, J., Mosnier, J.F., Scotet, E., Bonneville, M., and Jotereau, F. (2005). V 9V 2 T Cell Response to Colon Carcinoma Cells. *The Journal of Immunology* 175, 5481-5488.

Couzi, L., Levaillant, Y., Jamai, A., Pitard, V., Lassalle, R., Martin, K., Garrigue, I., Hawchar, O., Siberchicot, F., Moore, N., *et al.* (2010). Cytomegalovirus-induced gammadelta T cells associate with reduced cancer risk after kidney transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21, 181-188.

Couzi, L., Pitard, V., Moreau, J.F., Merville, P., and Dechanet-Merville, J. (2015). Direct and Indirect Effects of Cytomegalovirus-Induced gammadelta T Cells after Kidney Transplantation. *Frontiers in immunology* 6, 3.

Couzi, L., Pitard, V., Sicard, X., Garrigue, I., Hawchar, O., Merville, P., Moreau, J.F., and Dechanet-Merville, J. (2012). Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human gammadelta T cells expressing CD16 (FcgammaRIIIa). *Blood* 119, 1418-1427.

Crough, T., and Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clinical microbiology reviews* 22, 76-98, Table of Contents.

Cummings, J.S., Cairo, C., Armstrong, C., Davis, C.E., and Pauza, C.D. (2008). Impacts of HIV infection on Vgamma2Vdelta2 T cell phenotype and function: a mechanism for reduced tumor immunity in AIDS. *Journal of leukocyte biology* 84, 371-379.

Dai, X., Yu, X., Gong, H., Jiang, X., Abenes, G., Liu, H., Shivakoti, S., Britt, W.J., Zhu, H., Liu, F., *et al.* (2013). The smallest capsid protein mediates binding of the essential tegument protein

pp150 to stabilize DNA-containing capsids in human cytomegalovirus. *PLoS pathogens* 9, e1003525.

Dar, A.A., Patil, R.S., and Chiplunkar, S.V. (2014). Insights into the Relationship between Toll Like Receptors and Gamma Delta T Cell Responses. *Frontiers in immunology* 5, 366.

Das, H., Groh, V., Kuijl, C., Sugita, M., Morita, C.T., Spies, T., and Bukowski, J.F. (2001a). MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity* 15, 83-93.

Das, H., Wang, L., Kamath, A., and Bukowski, J.F. (2001b). Vgamma2Vdelta2 T-cell receptor-mediated recognition of aminobisphosphonates. *Blood* 98, 1616-1618.

David, P., Nguyen, H., Barbier, A., and Baron, R. (1996). The bisphosphonate tiludronate is a potent inhibitor of the osteoclast vacuolar H(+)-ATPase. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 11, 1498-1507.

Davignon, J.L., Castanie, P., Yorke, J.A., Gautier, N., Clement, D., and Davrinche, C. (1996). Anti-human cytomegalovirus activity of cytokines produced by CD4+ T-cell clones specifically activated by IE1 peptides in vitro. *Journal of virology* 70, 2162-2169.

De Paoli, P., Gennari, D., Martelli, P., Basaglia, G., Crovatto, M., Battistin, S., and Santini, G. (1991). A subset of gamma delta lymphocytes is increased during HIV-1 infection. *Clinical and experimental immunology* 83, 187-191.

Decaup, E., Duault, C., Bezombes, C., Poupot, M., Savina, A., Olive, D., and Fournie, J.J. (2014). Phosphoantigens and butyrophilin 3A1 induce similar intracellular activation signaling in human TCRVgamma9+ gammadelta T lymphocytes. *Immunology letters* 161, 133-137.

Dechanet, J., Merville, P., Berge, F., Bone-Mane, G., Taupin, J.L., Michel, P., Joly, P., Bonneville, M., Potaux, L., and Moreau, J.F. (1999a). Major expansion of gammadelta T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients. *The Journal of infectious diseases* 179, 1-8.

Dechanet, J., Merville, P., Lim, A., Retiere, C., Pitard, V., Lafarge, X., Michelson, S., Meric, C., Hallet, M.M., Kourilsky, P., *et al.* (1999b). Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *The Journal of clinical investigation* 103, 1437-1449.

Delale, T., Paquin, A., Asselin-Paturel, C., Dalod, M., Brizard, G., Bates, E.E.M., Kastner, P., Chan, S., Akira, S., Vicari, A., *et al.* (2005). MyD88-Dependent and -Independent Murine Cytomegalovirus Sensing for IFN- Release and Initiation of Immune Responses In Vivo. *The Journal of Immunology* 175, 6723-6732.

Della Chiesa, M., Falco, M., Muccio, L., Bertaina, A., Locatelli, F., and Moretta, A. (2013). Impact of HCMV Infection on NK Cell Development and Function after HSCT. *Frontiers in immunology* 4, 458.

Deniger, D.C., Maiti, S.N., Mi, T., Switzer, K.C., Ramachandran, V., Hurton, L.V., Ang, S., Olivares, S., Rabinovich, B.A., Huls, M.H., *et al.* (2014). Activating and propagating polyclonal gamma delta T cells with broad specificity for malignancies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20, 5708-5719.

Devaud, C., Bilhere, E., Loizon, S., Pitard, V., Behr, C., Moreau, J.F., Dechanet-Merville, J., and Capone, M. (2009). Antitumor activity of gammadelta T cells reactive against cytomegalovirus-infected cells in a mouse xenograft tumor model. *Cancer research* 69, 3971-3978.

Devaud, C., Rousseau, B., Netzer, S., Pitard, V., Paroissin, C., Khairallah, C., Costet, P., Moreau, J.F., Couillaud, F., Dechanet-Merville, J., *et al.* (2013). Anti-metastatic potential of human Vdelta1(+) gammadelta T cells in an orthotopic mouse xenograft model of colon carcinoma. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 62, 1199-1210.

Dhar, S., and Chiplunkar, S.V. (2010). Lysis of aminobisphosphonate-sensitized MCF-7 breast tumor cells by Vgamma9Vdelta2 T cells. *Cancer immunity* 10, 10.

Dieli, F., Troye-Blomberg, M., Ivanyi, J., Fournie, J.J., Krensky, A.M., Bonneville, M., Peyrat, M.A., Caccamo, N., Sireci, G., and Salerno, A. (2001). Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *The Journal of infectious diseases* 184, 1082-1085.

Dimova, T., Brouwer, M., Gosselin, F., Tassignon, J., Leo, O., Donner, C., Marchant, A., and Vermijlen, D. (2015). Effector Vgamma9Vdelta2 T cells dominate the human fetal gammadelta T-cell repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

Dollard, S.C., Grosse, S.D., and Ross, D.S. (2007). New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Reviews in medical virology* 17, 355-363.

Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature reviews Cancer* 4, 11-22.

Dunne, M.R., Mangan, B.A., Madrigal-Estebas, L., and Doherty, D.G. (2010). Preferential Th1 cytokine profile of phosphoantigen-stimulated human Vgamma9Vdelta2 T cells. *Mediators of inflammation* 2010, 704941.

Eberl, M., Hintz, M., Reichenberg, A., Kollas, A.K., Wiesner, J., and Jomaa, H. (2003). Microbial isoprenoid biosynthesis and human gammadelta T cell activation. *FEBS letters* 544, 4-10.

Elkington, R., Shoukry, N.H., Walker, S., Crough, T., Fazou, C., Kaur, A., Walker, C.M., and Khanna, R. (2004). Cross-reactive recognition of human and primate cytomegalovirus sequences by human CD4 cytotoxic T lymphocytes specific for glycoprotein B and H. *European journal of immunology* 34, 3216-3226.

Fausther-Bovendo, H., Wauquier, N., Cherfils-Vicini, J., Cremer, I., Debre, P., and Vieillard, V. (2008). NKG2C is a major triggering receptor involved in the V[delta]1 T cell-mediated cytotoxicity against HIV-infected CD4 T cells. *Aids* 22, 217-226.

Fielding, C.A., Aicheler, R., Stanton, R.J., Wang, E.C., Han, S., Seirafian, S., Davies, J., McSharry, B.P., Weekes, M.P., Antrobus, P.R., *et al.* (2014). Two Novel Human Cytomegalovirus NK Cell Evasion Functions Target MICA for Lysosomal Degradation. *PLoS pathogens* 10, e1004058.

Fisch, P., Malkovsky, M., Kovats, S., Sturm, E., Braakman, E., Klein, B.S., Voss, S.D., Morrissey, L.W., DeMars, R., Welch, W.J., *et al.* (1990). Recognition by human V gamma 9/V delta 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science* 250, 1269-1273.

Fisch, P., Meuer, E., Pende, D., Rothenfusser, S., Viale, O., Kock, S., Ferrone, S., Fradelizi, D., Klein, G., Moretta, L., *et al.* (1997). Control of B cell lymphoma recognition via natural killer

inhibitory receptors implies a role for human Vgamma9/Vdelta2 T cells in tumor immunity. *European journal of immunology* 27, 3368-3379.

Fischer, S., Scheffler, A., and Kabelitz, D. (1996). Activation of human gamma delta T-cells by heat-treated mistletoe plant extracts. *Immunology letters* 52, 69-72.

Fisher, J.P., Yan, M., Heuvelink, J., Carter, L., Abolhassani, A., Frosch, J., Wallace, R., Flutter, B., Capsomidis, A., Hubank, M., *et al.* (2014). Neuroblastoma killing properties of Vdelta2 and Vdelta2-negative gammadeltaT cells following expansion by artificial antigen-presenting cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20, 5720-5732.

Foca, E., Motta, D., Pollara, C., Brianese, N., Gotti, D., Albini, L., Quiros-Roldan, E., Torti, C., and Manca, N. (2012). Impact of detectable human cytomegalovirus DNAemia on viro-immunological effectiveness of HAART in HIV-infected patients naive to antiretroviral therapy. *The new microbiologica* 35, 227-231.

Foley, B., Cooley, S., Verneris, M.R., Pitt, M., Curtsinger, J., Luo, X., Lopez-Verges, S., Lanier, L.L., Weisdorf, D., and Miller, J.S. (2012). Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. *Blood* 119, 2665-2674.

Fornara, C., Lilleri, D., Revello, M.G., Furione, M., Zavattoni, M., Lenta, E., and Gerna, G. (2011). Kinetics of effector functions and phenotype of virus-specific and gammadelta T lymphocytes in primary human cytomegalovirus infection during pregnancy. *Journal of clinical immunology* 31, 1054-1064.

Fortunato, E.A., McElroy, A.K., Sanchez, I., and Spector, D.H. (2000). Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends Microbiol* 8, 111-119.

Fournie, J.J., Sicard, H., Poupot, M., Bezombes, C., Blanc, A., Romagne, F., Ysebaert, L., and Laurent, G. (2013). What lessons can be learned from gammadelta T cell-based cancer immunotherapy trials? *Cellular & molecular immunology* 10, 35-41.

Fournier, P., Boissier, S., Filleur, S., Guglielmi, J., Cabon, F., Colombel, M., and Clezardin, P. (2002). Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer research* 62, 6538-6544.

Fouts, A.E., Chan, P., Stephan, J.P., Vandlen, R., and Feierbach, B. (2012). Antibodies against the gH/gL/UL128/UL130/UL131 complex comprise the majority of the anti-cytomegalovirus (anti-CMV) neutralizing antibody response in CMV hyperimmune globulin. *Journal of virology* 86, 7444-7447.

Fowler, K.B., Stagno, S., Pass, R.F., Britt, W.J., Boll, T.J., and Alford, C.A. (1992). The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *The New England journal of medicine* 326, 663-667.

Frith, J.C., Monkkonen, J., Blackburn, G.M., Russell, R.G., and Rogers, M.J. (1997). Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 12, 1358-1367.

Furman, D., Jojic, V., Sharma, S., Shen-Orr, S.S., Angel, C.J., Onengut-Gumuscu, S., Kidd, B.A., Maecker, H.T., Concannon, P., Dekker, C.L., *et al.* (2015). Cytomegalovirus infection enhances the immune response to influenza. *Science translational medicine* 7, 281ra243.

Gamadia, L.E., Remmerswaal, E.B., Weel, J.F., Bemelman, F., van Lier, R.A., and Ten Berge, I.J. (2003). Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease. *Blood* 101, 2686-2692.

Gan, Y.H., Pauza, C.D., and Malkovsky, M. (1995). Gamma delta T cells in rhesus monkeys and their response to simian immunodeficiency virus (SIV) infection. *Clinical and experimental immunology* 102, 251-255.

Gandhi, M.K., and Khanna, R. (2004). Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *The Lancet Infectious Diseases* 4, 725-738.

Gertner-Dardenne, J., Bonnafous, C., Bezombes, C., Capietto, A.H., Scaglione, V., Ingoure, S., Cendron, D., Gross, E., Lepage, J.F., Quillet-Mary, A., *et al.* (2009). Bromohydrin pyrophosphate enhances antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by therapeutic antibodies. *Blood* 113, 4875-4884.

Gilbert, M.J., Riddell, S.R., Li, C.R., and Greenberg, P.D. (1993). Selective interference with class I major histocompatibility complex presentation of the major immediate-early protein following infection with human cytomegalovirus. *Journal of virology* 67, 3461-3469.

Girardi, M. (2006). Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. *The Journal of investigative dermatology* 126, 25-31.

Girardi, M., Oppenheim, D.E., Steele, C.R., Lewis, J.M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R.E., and Hayday, A.C. (2001). Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294, 605-609.

Gober, H.J., Kistowska, M., Angman, L., Jenö, P., Mori, L., and De Libero, G. (2003). Human T Cell Receptor Cells Recognize Endogenous Mevalonate Metabolites in Tumor Cells. *Journal of Experimental Medicine* 197, 163-168.

Goodrum, F., Caviness, K., and Zagallo, P. (2012). Human cytomegalovirus persistence. *Cellular microbiology* 14, 644-655.

Goodrum, F., Reeves, M., Sinclair, J., High, K., and Shenk, T. (2007). Human cytomegalovirus sequences expressed in latently infected individuals promote a latent infection in vitro. *Blood* 110, 937-945.

Griffiths, P., Baraniak, I., and Reeves, M. (2015). The pathogenesis of human cytomegalovirus. *The Journal of pathology* 235, 288-297.

Griffiths, P., Plotkin, S., Mocarski, E., Pass, R., Schleiss, M., Krause, P., and Bialek, S. (2013). Desirability and feasibility of a vaccine against cytomegalovirus. *Vaccine* 31 Suppl 2, B197-203.

Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K.H., and Spies, T. (1999). Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6879-6884.

Gu, S., Nawrocka, W., and Adams, E.J. (2014). Sensing of Pyrophosphate Metabolites by Vgamma9Vdelta2 T Cells. *Frontiers in immunology* 5, 688.

Guerville, F., Daburon, S., Marlin, R., Lartigue, L., Loizon, S., Pitard, V., Couzi, L., Moreau, J.F., Dechanet-Merville, J., and Faustin, B. (2015). TCR-dependent sensitization of human gammadelta T cells to non-myeloid IL-18 in cytomegalovirus and tumor stress surveillance. *Oncoimmunology* 4, e1003011.

Halary, F., Amara, A., Lortat-Jacob, H., Messerle, M., Delaunay, T., Houles, C., Fieschi, F., Arenzana-Seisdedos, F., Moreau, J.F., and Dechanet-Merville, J. (2002). Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* 17, 653-664.

Halary, F., Peyrat, M.A., Champagne, E., Lopez-Botet, M., Moretta, A., Moretta, L., Vie, H., Fournie, J.J., and Bonneville, M. (1997). Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes expressing gamma delta T cell receptors by natural killer inhibitory receptors. *European journal of immunology* 27, 2812-2821.

Halary, F., Pitard, V., Dlubek, D., Krzysiek, R., de la Salle, H., Merville, P., Dromer, C., Emilie, D., Moreau, J.F., and Dechanet-Merville, J. (2005). Shared reactivity of V δ 2(neg) {gamma}{delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *The Journal of experimental medicine* 201, 1567-1578.

Halenius, A., Gerke, C., and Hengel, H. (2015). Classical and non-classical MHC I molecule manipulation by human cytomegalovirus: so many targets-but how many arrows in the quiver? *Cell Mol Immunol* 12, 139-153.

Hamprecht, K., Maschmann, J., Jahn, G., Poets, C.F., and Goelz, R. (2008). Cytomegalovirus transmission to preterm infants during lactation. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 41, 198-205.

Hanley, P.J., and Bollard, C.M. (2014). Controlling cytomegalovirus: helping the immune system take the lead. *Viruses* 6, 2242-2258.

Hansen, S.G., Powers, C.J., Richards, R., Ventura, A.B., Ford, J.C., Siess, D., Axthelm, M.K., Nelson, J.A., Jarvis, M.A., Picker, L.J., *et al.* (2010). Evasion of CD8⁺ T cells is critical for superinfection by cytomegalovirus. *Science* 328, 102-106.

Harly, C., Guillaume, Y., Nedellec, S., Peigne, C.M., Monkkonen, H., Monkkonen, J., Li, J., Kuball, J., Adams, E.J., Netzer, S., *et al.* (2012). Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human gammadelta T-cell subset. *Blood* 120, 2269-2279.

Harly, C., Peigne, C.M., and Scotet, E. (2014). Molecules and Mechanisms Implicated in the Peculiar Antigenic Activation Process of Human Vgamma9Vdelta2 T Cells. *Frontiers in immunology* 5, 657.

Harris, L.D., Klatt, N.R., Vinton, C., Briant, J.A., Tabb, B., Ladell, K., Lifson, J., Estes, J.D., Price, D.A., Hirsch, V.M., *et al.* (2010). Mechanisms underlying gammadelta T-cell subset perturbations in SIV-infected Asian rhesus macaques. *Blood* 116, 4148-4157.

Harrison, C.J., Britt, W.J., Chapman, N.M., Mullican, J., and Tracy, S. (1995). Reduced congenital cytomegalovirus (CMV) infection after maternal immunization with a guinea pig CMV glycoprotein before gestational primary CMV infection in the guinea pig model. *The Journal of infectious diseases* 172, 1212-1220.

Hegde, N.R., Tomazin, R.A., Wisner, T.W., Dunn, C., Boname, J.M., Lewinsohn, D.M., and Johnson, D.C. (2002). Inhibition of HLA-DR Assembly, Transport, and Loading by Human

Cytomegalovirus Glycoprotein US3: a Novel Mechanism for Evading Major Histocompatibility Complex Class II Antigen Presentation. *Journal of virology* 76, 10929-10941.

Hermier, F., Comby, E., Delaunay, A., Petitjean, J., Favennec, L., Bazin, C., Freymuth, F., and Ballet, J.J. (1993). Decreased blood TcR gamma delta+ lymphocytes in AIDS and p24-antigenemic HIV-1-infected patients. *Clinical immunology and immunopathology* 69, 248-250.

Hobom, U., Brune, W., Messerle, M., Hahn, G., and Koszinowski, U.H. (2000). Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes. *Journal of virology* 74, 7720-7729.

Hokeness-Antonelli, K.L., Crane, M.J., Dragoi, A.M., Chu, W.M., and Salazar-Mather, T.P. (2007). IFN- α -mediated inflammatory responses and antiviral defense in liver is TLR9-independent but MyD88-dependent during murine cytomegalovirus infection. *Journal of immunology* 179, 6176-6183.

Hudspeth, K., Fogli, M., Correia, D.V., Mikulak, J., Roberto, A., Della Bella, S., Silva-Santos, B., and Mavilio, D. (2012). Engagement of NKp30 on Vdelta1 T cells induces the production of CCL3, CCL4, and CCL5 and suppresses HIV-1 replication. *Blood* 119, 4013-4016.

Hughes, D.E., Wright, K.R., Uy, H.L., Sasaki, A., Yoneda, T., Roodman, G.D., Mundy, G.R., and Boyce, B.F. (1995). Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 10, 1478-1487.

Iida, K.T., Kawakami, Y., Suzuki, H., Sone, H., Shimano, H., Toyoshima, H., Okuda, Y., and Yamada, N. (2002). PPAR gamma ligands, troglitazone and pioglitazone, up-regulate expression of HMG-CoA synthase and HMG-CoA reductase gene in THP-1 macrophages. *FEBS letters* 520, 177-181.

Iversen, A.C., Norris, P.S., Ware, C.F., and Benedict, C.A. (2005). Human NK Cells Inhibit Cytomegalovirus Replication through a Noncytolytic Mechanism Involving Lymphotoxin-Dependent Induction of IFN- γ . *The Journal of Immunology* 175, 7568-7574.

Jackson, S.E., Mason, G.M., and Wills, M.R. (2011). Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. *Virus research* 157, 151-160.

Jauhainen, M., Monkkonen, H., Raikonen, J., Monkkonen, J., and Auriola, S. (2009). Analysis of endogenous ATP analogs and mevalonate pathway metabolites in cancer cell cultures using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of chromatography*.

Jenkins, C., Abendroth, A., and Slobedman, B. (2004). A Novel Viral Transcript with Homology to Human Interleukin-10 Is Expressed during Latent Human Cytomegalovirus Infection. *Journal of virology* 78, 1440-1447.

Jones, T.R., Wiertz, E.J., Sun, L., Fish, K.N., Nelson, J.A., and Ploegh, H.L. (1996). Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 11327-11333.

Jonjic, S., Pavic, I., Lucin, P., Rukavina, D., and Koszinowski, U.H. (1990). Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes. *Journal of virology* 64, 5457-5464.

Jordan, M.C. (1983). Latent infection and the elusive cytomegalovirus. *Reviews of infectious diseases* 5, 205-215.

Jost, N.H., Abel, S., Hutzler, M., Sparwasser, T., Zimmermann, A., Roers, A., Muller, W., Klopffleisch, R., Hengel, H., Westendorf, A.M., *et al.* (2014). Regulatory T cells and T-cell-derived IL-10 interfere with effective anti-cytomegalovirus immune response. *Immunology and cell biology* 92, 860-871.

Kabelitz, D., Wesch, D., Pitters, E., and Zoller, M. (2004). Characterization of Tumor Reactivity of Human V 9V 2 T Cells In Vitro and in SCID Mice In Vivo. *The Journal of Immunology* 173, 6767-6776.

Karunakaran, M.M., and Herrmann, T. (2014). The Vgamma9Vdelta2 T Cell Antigen Receptor and Butyrophilin-3 A1: Models of Interaction, the Possibility of Co-Evolution, and the Case of Dendritic Epidermal T Cells. *Frontiers in immunology* 5, 648.

Kato, Y., Tanaka, Y., Hayashi, M., Okawa, K., and Minato, N. (2006). Involvement of CD166 in the activation of human gamma delta T cells by tumor cells sensitized with nonpeptide antigens. *Journal of immunology* 177, 877-884.

Kato, Y., Tanaka, Y., Tanaka, H., Yamashita, S., and Minato, N. (2003). Requirement of species-specific interactions for the activation of human gamma delta T cells by pamidronate. *Journal of immunology* 170, 3608-3613.

Khairallah, C., Netzer, S., Villacreces, A., Juzan, M., Rousseau, B., Dulanto, S., Giese, A., Costet, P., Praloran, V., Moreau, J.F., *et al.* (2015). gammadelta T cells confer protection against murine cytomegalovirus (MCMV). *PLoS pathogens* 11, e1004702.

Khan, N., Bruton, R., Taylor, G.S., Cobbold, M., Jones, T.R., Rickinson, A.B., and Moss, P.A. (2005). Identification of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro is greatly enhanced by the use of recombinant virus lacking the US2 to US11 region or modified vaccinia virus Ankara expressing individual viral genes. *Journal of virology* 79, 2869-2879.

Kim, S., Lee, S., Shin, J., Kim, Y., Evnouchidou, I., Kim, D., Kim, Y.K., Kim, Y.E., Ahn, J.H., Riddell, S.R., *et al.* (2011). Human cytomegalovirus microRNA miR-US4-1 inhibits CD8(+) T cell responses by targeting the aminopeptidase ERAP1. *Nature immunology* 12, 984-991.

Knight, A., Madrigal, A.J., Grace, S., Sivakumaran, J., Kottaridis, P., Mackinnon, S., Travers, P.J., and Lowdell, M.W. (2010). The role of Vdelta2-negative gammadelta T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 116, 2164-2172.

Kobayashi, H., and Tanaka, Y. (2015). gammadelta T Cell Immunotherapy-A Review. *Pharmaceuticals* 8, 40-61.

Kollas, A.K., Duin, E.C., Eberl, M., Altincicek, B., Hintz, M., Reichenberg, A., Henschker, D., Henne, A., Steinbrecher, I., Ostrovsky, D.N., *et al.* (2002). Functional characterization of GcpE, an essential enzyme of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEBS letters* 532, 432-436.

Komatsu, T.E., Pikis, A., Naeger, L.K., and Harrington, P.R. (2014). Resistance of human cytomegalovirus to ganciclovir/valganciclovir: a comprehensive review of putative resistance pathways. *Antiviral research* 101, 12-25.

- Kotenko, S.V., Sacconi, S., Izotova, L.S., Mirochnitchenko, O.V., and Pestka, S. (2000). Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1695-1700.
- Kunzmann, V., Bauer, E., Feurle, J., Weissinger, F., Tony, H.P., and Wilhelm, M. (2000). Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* 96, 384-392.
- Kunzmann, V., Bauer, E., and Wilhelm, M. (1999). Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. *The New England journal of medicine* 340, 737-738.
- Kuroda, J., Kimura, S., Segawa, H., Sato, K., Matsumoto, S., Nogawa, M., Yuasa, T., Kobayashi, Y., Yoshikawa, T., Ottmann, O.G., *et al.* (2004). p53-independent anti-tumor effects of the nitrogen-containing bisphosphonate zoledronic acid. *Cancer science* 95, 186-192.
- Lafarge, X., Merville, P., Cazin, M.C., Berge, F., Potaux, L., Moreau, J.F., and Dechanet-Merville, J. (2001). Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *The Journal of infectious diseases* 184, 533-541.
- Lafont, V., Liautard, J., Liautard, J.P., and Favero, J. (2001). Production of TNF- by Human V 9V 2 T Cells Via Engagement of Fc RIIIA, the Low Affinity Type 3 Receptor for the Fc Portion of IgG, Expressed upon TCR Activation by Nonpeptidic Antigen. *The Journal of Immunology* 166, 7190-7199.
- Lafont, V., Sanchez, F., Laprevotte, E., Michaud, H.A., Gros, L., Eliaou, J.F., and Bonnefoy, N. (2014). Plasticity of gammadelta T Cells: Impact on the Anti-Tumor Response. *Frontiers in immunology* 5, 622.
- Lanca, T., Correia, D.V., Moita, C.F., Raquel, H., Neves-Costa, A., Ferreira, C., Ramalho, J.S., Barata, J.T., Moita, L.F., Gomes, A.Q., *et al.* (2010). The MHC class Ib protein ULBP1 is a nonredundant determinant of leukemia/lymphoma susceptibility to gammadelta T-cell cytotoxicity. *Blood* 115, 2407-2411.
- Lang, F., Peyrat, M.A., Constant, P., Davodeau, F., David-Ameline, J., Poquet, Y., Vie, H., Fournie, J.J., and Bonneville, M. (1995). Early activation of human V gamma 9V delta 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Journal of immunology* 154, 5986-5994.
- Lehner, T., Mitchell, E., Bergmeier, L., Singh, M., Spallek, R., Cranage, M., Hall, G., Dennis, M., Villinger, F., and Wang, Y. (2000). The role of gammadelta T cells in generating antiviral factors and beta-chemokines in protection against mucosal simian immunodeficiency virus infection. *European journal of immunology* 30, 2245-2256.
- Lesport, E., Baudhuin, J., Sousa, S., LeMaout, J., Zamborlini, A., Rouas-Freiss, N., Carosella, E.D., and Favier, B. (2011). Inhibition of human gamma delta [corrected] T-cell antitumoral activity through HLA-G: implications for immunotherapy of cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68, 3385-3399.
- Li, B., Bassiri, H., Rossman, M.D., Kramer, P., Eyuboglu, A.F., Torres, M., Sada, E., Imir, T., and Carding, S.R. (1998). Involvement of the Fas/Fas ligand pathway in activation-induced cell death of mycobacteria-reactive human gamma delta T cells: a mechanism for the loss of gamma delta T cells in patients with pulmonary tuberculosis. *Journal of immunology* 161, 1558-1567.

Li, H., Xiang, Z., Feng, T., Li, J., Liu, Y., Fan, Y., Lu, Q., Yin, Z., Yu, M., Shen, C., *et al.* (2013). Human Vgamma9Vdelta2-T cells efficiently kill influenza virus-infected lung alveolar epithelial cells. *Cellular & molecular immunology* 10, 159-164.

Lilja, A.E., and Mason, P.W. (2012). The next generation recombinant human cytomegalovirus vaccine candidates-beyond gB. *Vaccine* 30, 6980-6990.

Lodoen, M.B., and Lanier, L.L. (2005). Viral modulation of NK cell immunity. *Nature reviews Microbiology* 3, 59-69.

Loewendorf, A., and Benedict, C.A. (2010). Modulation of host innate and adaptive immune defenses by cytomegalovirus: timing is everything. *Journal of internal medicine* 267, 483-501.

Lucia, M., Crespo, E., Cruzado, J.M., Grinyo, J.M., and Bestard, O. (2014). Human CMV-specific T-cell responses in kidney transplantation; toward changing current risk-stratification paradigm. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 27, 643-656.

Lucin, P., Mahmutefendic, H., Blagojevic Zagorac, G., and Ilic Tomas, M. (2015). Cytomegalovirus immune evasion by perturbation of endosomal trafficking. *Cellular & molecular immunology* 12, 154-169.

Luo, M.H., Schwartz, P.H., and Fortunato, E.A. (2008). Neonatal neural progenitor cells and their neuronal and glial cell derivatives are fully permissive for human cytomegalovirus infection. *Journal of virology* 82, 9994-10007.

Luoma, A.M., Castro, C.D., Mayassi, T., Bembinster, L.A., Bai, L., Picard, D., Anderson, B., Scharf, L., Kung, J.E., Sibener, L.V., *et al.* (2013). Crystal structure of Vdelta1 T cell receptor in complex with CD1d-sulfatide shows MHC-like recognition of a self-lipid by human gammadelta T cells. *Immunity* 39, 1032-1042.

Luse, S.A., and Smith, M.G. (1958). Electron microscopy of salivary gland viruses. *The Journal of experimental medicine* 107, 623-632.

Magri, G., Muntasell, A., Romo, N., Saez-Borderias, A., Pende, D., Geraghty, D.E., Hengel, H., Angulo, A., Moretta, A., and Lopez-Botet, M. (2011). Nkp46 and DNAM-1 NK-cell receptors drive the response to human cytomegalovirus-infected myeloid dendritic cells overcoming viral immune evasion strategies. *Blood* 117, 848-856.

Maidji, E., Nigro, G., Tabata, T., McDonagh, S., Nozawa, N., Shiboski, S., Muci, S., Anceschi, M.M., Aziz, N., Adler, S.P., *et al.* (2010). Antibody treatment promotes compensation for human cytomegalovirus-induced pathogenesis and a hypoxia-like condition in placentas with congenital infection. *The American journal of pathology* 177, 1298-1310.

Marin, R., Ruiz-Cabello, F., Pedrinaci, S., Mendez, R., Jimenez, P., Geraghty, D.E., and Garrido, F. (2003). Analysis of HLA-E expression in human tumors. *Immunogenetics* 54, 767-775.

Mason, G.M., Jackson, S., Okecha, G., Poole, E., Sissons, J.G., Sinclair, J., and Wills, M.R. (2013). Human cytomegalovirus latency-associated proteins elicit immune-suppressive IL-10 producing CD4(+) T cells. *PLoS pathogens* 9, e1003635.

Matis, L.A., Fry, A.M., Cron, R.Q., Cotterman, M.M., Dick, R.F., and Bluestone, J.A. (1989). Structure and specificity of a class II MHC alloreactive gamma delta T cell receptor heterodimer. *Science* 245, 746-749.

- Matlaf, L.A., Harkins, L.E., Bezrookove, V., Cobbs, C.S., and Soroceanu, L. (2013). Cytomegalovirus pp71 protein is expressed in human glioblastoma and promotes pro-angiogenic signaling by activation of stem cell factor. *PLoS one* 8, e68176.
- Mattarollo, S.R., Kenna, T., Nieda, M., and Nicol, A.J. (2007). Chemotherapy and zoledronate sensitize solid tumour cells to Vgamma9Vdelta2 T cell cytotoxicity. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 56, 1285-1297.
- McGeoch, D.J., Dolan, A., and Ralph, A.C. (2000). Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *Journal of virology* 74, 10401-10406.
- Miyagawa, F., Tanaka, Y., Yamashita, S., and Minato, N. (2001). Essential Requirement of Antigen Presentation by Monocyte Lineage Cells for the Activation of Primary Human T Cells by Aminobisphosphonate Antigen. *The Journal of Immunology* 166, 5508-5514.
- Mocarski, E., Shenk, T., and Pass, R. (2007a). Cytomegaloviruses. *Fields Virology* 2.
- Mocarski, E., Shenk, T., and Pass, R. (2007b). Cytomegaloviruses. *Fields Virology* 2, 2703.
- Mocarski, E., Shenk, T., and Pass, R. (2007c). Cytomegaloviruses. *Fields Virology* 2, 2716-2728.
- Monkkonen, H., Auriola, S., Lehenkari, P., Kellinsalmi, M., Hassinen, I.E., Vepsäläinen, J., and Monkkonen, J. (2006). A new endogenous ATP analog (Apppl) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *British journal of pharmacology* 147, 437-445.
- Monkkonen, H., Ottewill, P.D., Kuokkanen, J., Monkkonen, J., Auriola, S., and Holen, I. (2007). Zoledronic acid-induced IPP/Apppl production in vivo. *Life sciences* 81, 1066-1070.
- Mookerjee-Basu, J., Vantourout, P., Martinez, L.O., Perret, B., Collet, X., Perigaud, C., Peyrottes, S., and Champagne, E. (2010). F1-adenosine triphosphatase displays properties characteristic of an antigen presentation molecule for Vgamma9Vdelta2 T cells. *Journal of immunology* 184, 6920-6928.
- Mori, T., Kameda, H., Ogawa, H., Iizuka, A., Sekiguchi, N., Takei, H., Nagasawa, H., Tokuhira, M., Tanaka, T., Saito, Y., *et al.* (2004). Incidence of cytomegalovirus reactivation in patients with inflammatory connective tissue diseases who are under immunosuppressive therapy. *The Journal of rheumatology* 31, 1349-1351.
- Morita, C.T., Beckman, E.M., Bukowski, J.F., Tanaka, Y., Band, H., Bloom, B.R., Golan, D.E., and Brenner, M.B. (1995). Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity* 3, 495-507.
- Muntasell, A., Vilches, C., Angulo, A., and Lopez-Botet, M. (2013). Adaptive reconfiguration of the human NK-cell compartment in response to cytomegalovirus: a different perspective of the host-pathogen interaction. *European journal of immunology* 43, 1133-1141.
- Mutter, W., Reddehase, M.J., Busch, F.W., Buhring, H.J., and Koszinowski, U.H. (1988). Failure in generating hemopoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. *The Journal of experimental medicine* 167, 1645-1658.
- Navarro, D., Paz, P., Tugizov, S., Topp, K., La Vail, J., and Pereira, L. (1993). Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology* 197, 143-158.

- Nedellec, S., Sabourin, C., Bonneville, M., and Scotet, E. (2010). NKG2D costimulates human V gamma 9V delta 2 T cell antitumor cytotoxicity through protein kinase C theta-dependent modulation of early TCR-induced calcium and transduction signals. *Journal of immunology* 185, 55-63.
- Nigro, G., Adler, S.P., La Torre, R., Best, A.M., and Congenital Cytomegalovirus Collaborating, G. (2005). Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *The New England journal of medicine* 353, 1350-1362.
- Ninomiya, T., Takimoto, H., Matsuzaki, G., Hamano, S., Yoshida, H., Yoshikai, Y., Kimura, G., and Nomoto, K. (2000). Vgamma1+ gammadelta T cells play protective roles at an early phase of murine cytomegalovirus infection through production of interferon-gamma. *Immunology* 99, 187-194.
- Noriega, V., Redmann, V., Gardner, T., and Tortorella, D. (2012). Diverse immune evasion strategies by human cytomegalovirus. *Immunologic research* 54, 140-151.
- Nussbaumer, O., Gruenbacher, G., Gander, H., Komuczki, J., Rahm, A., and Thurnher, M. (2013). Essential requirements of zoledronate-induced cytokine and gammadelta T cell proliferative responses. *Journal of immunology* 191, 1346-1355.
- Nussbaumer, O., Gruenbacher, G., Gander, H., and Thurnher, M. (2011). DC-like cell-dependent activation of human natural killer cells by the bisphosphonate zoledronic acid is regulated by gammadelta T lymphocytes. *Blood* 118, 2743-2751.
- O'Brien, R.L., Happ, M.P., Dallas, A., Cranfill, R., Hall, L., Lang, J., Fu, Y.X., Kubo, R., and Born, W. (1991). Recognition of a single hsp-60 epitope by an entire subset of gamma delta T lymphocytes. *Immunological reviews* 121, 155-170.
- Palakodeti, A., Sandstrom, A., Sundaresan, L., Harly, C., Nedellec, S., Olive, D., Scotet, E., Bonneville, M., and Adams, E.J. (2012). The molecular basis for modulation of human Vgamma9Vdelta2 T cell responses by CD277/butyrophilin-3 (BTN3A)-specific antibodies. *The Journal of biological chemistry* 287, 32780-32790.
- Par, G., Rukavina, D., Podack, E.R., Horanyi, M., Szekeres-Bartho, J., Hegedus, G., Paal, M., Szereday, L., Mozsik, G., and Par, A. (2002). Decrease in CD3-negative-CD8dim(+) and Vdelta2/Vgamma9 TcR+ peripheral blood lymphocyte counts, low perforin expression and the impairment of natural killer cell activity is associated with chronic hepatitis C virus infection. *Journal of hepatology* 37, 514-522.
- Pauza, C.D., Poonia, B., Li, H., Cairo, C., and Chaudhry, S. (2014). gammadelta T Cells in HIV Disease: Past, Present, and Future. *Frontiers in immunology* 5, 687.
- Peggs, K.S., Verfuerth, S., Pizzey, A., Khan, N., Guiver, M., Moss, P.A., and Mackinnon, S. (2003). Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *The Lancet* 362, 1375-1377.
- Pera, A., Campos, C., Corona, A., Sanchez-Correa, B., Tarazona, R., Larbi, A., and Solana, R. (2014). CMV latent infection improves CD8+ T response to SEB due to expansion of polyfunctional CD57+ cells in young individuals. *PloS one* 9, e88538.
- Pietschmann, K., Beetz, S., Welte, S., Martens, I., Gruen, J., Oberg, H.H., Wesch, D., and Kabelitz, D. (2009). Toll-like receptor expression and function in subsets of human gammadelta T lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology* 70, 245-255.

Pitard, V., Roumanes, D., Lafarge, X., Couzi, L., Garrigue, I., Lafon, M.E., Merville, P., Moreau, J.F., and Dechanet-Merville, J. (2008). Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood* 112, 1317-1324.

Poccia, F., Agrati, C., Castilletti, C., Bordi, L., Gioia, C., Horejsh, D., Ippolito, G., Chan, P.K., Hui, D.S., Sung, J.J., *et al.* (2006). Anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus immune responses: the role played by V gamma 9V delta 2 T cells. *The Journal of infectious diseases* 193, 1244-1249.

Poccia, F., Agrati, C., Martini, F., Capobianchi, M.R., Wallace, M., and Malkovsky, M. (2005). Antiviral reactivities of gammadelta T cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 7, 518-528.

Poccia, F., Battistini, L., Cipriani, B., Mancino, G., Martini, F., Gougeon, M.L., and Colizzi, V. (1999). Phosphoantigen-reactive Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes suppress in vitro human immunodeficiency virus type 1 replication by cell-released antiviral factors including CC chemokines. *The Journal of infectious diseases* 180, 858-861.

Poccia, F., Boullier, S., Lecoœur, H., Cochet, M., Poquet, Y., Colizzi, V., Fournie, J.J., and Gougeon, M.L. (1996). Peripheral V gamma 9/V delta 2 T cell deletion and anergy to nonpeptidic mycobacterial antigens in asymptomatic HIV-1-infected persons. *Journal of immunology* 157, 449-461.

Poccia, F., Cipriani, B., Vendetti, S., Colizzi, V., Poquet, Y., Battistini, L., Lopez-Botet, M., Fournie, J.J., and Gougeon, M.L. (1997). CD94/NKG2 inhibitory receptor complex modulates both anti-viral and anti-tumoral responses of polyclonal phosphoantigen-reactive V gamma 9V delta 2 T lymphocytes. *Journal of immunology* 159, 6009-6017.

Poccia, F., Gioia, C., Martini, F., Sacchi, A., Piacentini, P., Tempestilli, M., Agrati, C., Amendola, A., Abdeddaim, A., Vlassi, C., *et al.* (2009). Zoledronic acid and interleukin-2 treatment improves immunocompetence in HIV-infected persons by activating Vgamma9Vdelta2 T cells. *Aids* 23, 555-565.

Polic, B., Hengel, H., Krmpotic, A., Trgovcich, J., Pavic, I., Luccaronin, P., Jonjic, S., and Koszinowski, U.H. (1998). Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *The Journal of experimental medicine* 188, 1047-1054.

Ponroy, N., Taveira, A., Mueller, N.J., and Millard, A.L. (2015). Statins demonstrate a broad anti-cytomegalovirus activity in vitro in ganciclovir-susceptible and resistant strains. *Journal of medical virology* 87, 141-153.

Potena, L., Frascaroli, G., Grigioni, F., Lazzarotto, T., Magnani, G., Tomasi, L., Coccolo, F., Gabrielli, L., Magelli, C., Landini, M.P., *et al.* (2004). Hydroxymethyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibition limits cytomegalovirus infection in human endothelial cells. *Circulation* 109, 532-536.

Powers, C., and Fruh, K. (2008). Rhesus CMV: an emerging animal model for human CMV. *Medical microbiology and immunology* 197, 109-115.

Prichard, M.N., Penfold, M.E., Duke, G.M., Spaete, R.R., and Kemble, G.W. (2001). A review of genetic differences between limited and extensively passaged human cytomegalovirus strains. *Reviews in medical virology* 11, 191-200.

- Prod'homme, V., Griffin, C., Aicheler, R.J., Wang, E.C., McSharry, B.P., Rickards, C.R., Stanton, R.J., Borysiewicz, L.K., Lopez-Botet, M., Wilkinson, G.W., *et al.* (2007). The human cytomegalovirus MHC class I homolog UL18 inhibits LIR-1+ but activates LIR-1- NK cells. *Journal of immunology* 178, 4473-4481.
- Qin, G., Liu, Y., Zheng, J., Ng, I.H., Xiang, Z., Lam, K.T., Mao, H., Li, H., Peiris, J.S., Lau, Y.L., *et al.* (2011). Type 1 responses of human Vgamma9Vdelta2 T cells to influenza A viruses. *Journal of virology* 85, 10109-10116.
- Qin, G., Mao, H., Zheng, J., Sia, S.F., Liu, Y., Chan, P.L., Lam, K.T., Peiris, J.S., Lau, Y.L., and Tu, W. (2009). Phosphoantigen-expanded human gammadelta T cells display potent cytotoxicity against monocyte-derived macrophages infected with human and avian influenza viruses. *The Journal of infectious diseases* 200, 858-865.
- Quinnan, G.V., Jr., Kirmani, N., Rook, A.H., Manischewitz, J.F., Jackson, L., Moreschi, G., Santos, G.W., Saral, R., and Burns, W.H. (1982). Cytotoxic t cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *The New England journal of medicine* 307, 7-13.
- Raulet, D.H., Gasser, S., Gowen, B.G., Deng, W., and Jung, H. (2013). Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annual review of immunology* 31, 413-441.
- Rauwel, B., Jang, S.M., Cassano, M., Kapopoulou, A., Barde, I., and Trono, D. (2015). Release of human cytomegalovirus from latency by a KAP1/TRIM28 phosphorylation switch. *eLife* 4.
- Rauwel, B., Mariame, B., Martin, H., Nielsen, R., Allart, S., Pipy, B., Mandrup, S., Devignes, M.D., Evain-Brion, D., Fournier, T., *et al.* (2010). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by human cytomegalovirus for de novo replication impairs migration and invasiveness of cytotrophoblasts from early placentas. *Journal of virology* 84, 2946-2954.
- Reeves, M., and Sinclair, J. (2013). Regulation of human cytomegalovirus transcription in latency: beyond the major immediate-early promoter. *Viruses* 5, 1395-1413.
- Reeves, M.B., Lehner, P.J., Sissons, J.G., and Sinclair, J.H. (2005a). An in vitro model for the regulation of human cytomegalovirus latency and reactivation in dendritic cells by chromatin remodelling. *The Journal of general virology* 86, 2949-2954.
- Reeves, M.B., MacAry, P.A., Lehner, P.J., Sissons, J.G., and Sinclair, J.H. (2005b). Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 4140-4145.
- Reeves, M.B., and Sinclair, J.H. (2010). Analysis of latent viral gene expression in natural and experimental latency models of human cytomegalovirus and its correlation with histone modifications at a latent promoter. *The Journal of general virology* 91, 599-604.
- Reusser, P., Cathomas, G., Attenhofer, R., Tamm, M., and Thiel, G. (1999). Cytomegalovirus (CMV)-specific T cell immunity after renal transplantation mediates protection from CMV disease by limiting the systemic virus load. *The Journal of infectious diseases* 180, 247-253.
- Reusser, P., Riddell, S.R., Meyers, J.D., and Greenberg, P.D. (1991). Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 78, 1373-1380.

- Rhodes, D.A., Chen, H.C., Price, A.J., Keeble, A.H., Davey, M.S., James, L.C., Eberl, M., and Trowsdale, J. (2015). Activation of human gammadelta T cells by cytosolic interactions of BTN3A1 with soluble phosphoantigens and the cytoskeletal adaptor periplakin. *Journal of immunology* 194, 2390-2398.
- Riano, F., Karunakaran, M.M., Starick, L., Li, J., Scholz, C.J., Kunzmann, V., Olive, D., Amslinger, S., and Herrmann, T. (2014). Vgamma9Vdelta2 TCR-activation by phosphorylated antigens requires butyrophilin 3 A1 (BTN3A1) and additional genes on human chromosome 6. *European journal of immunology* 44, 2571-2576.
- Riddell, S.R., Watanabe, K.S., Goodrich, J.M., Li, C.R., Agha, M.E., and Greenberg, P.D. (1992). Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257, 238-241.
- Riganti, C., Massaia, M., Davey, M.S., and Eberl, M. (2012). Human gammadelta T-cell responses in infection and immunotherapy: common mechanisms, common mediators? *European journal of immunology* 42, 1668-1676.
- Rincon-Orozco, B., Kunzmann, V., Wrobel, P., Kabelitz, D., Steinle, A., and Herrmann, T. (2005). Activation of V 9V 2 T Cells by NKG2D. *The Journal of Immunology* 175, 2144-2151.
- Rogers, M.J., Gordon, S., Benford, H.L., Coxon, F.P., Luckman, S.P., Monkkonen, J., and Frith, J.C. (2000). Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 88, 2961-2978.
- Rolle, A., Mousavi-Jazi, M., Eriksson, M., Odeberg, J., Soderberg-Naucler, C., Cosman, D., Karre, K., and Cerboni, C. (2003). Effects of human cytomegalovirus infection on ligands for the activating NKG2D receptor of NK cells: up-regulation of UL16-binding protein (ULBP)1 and ULBP2 is counteracted by the viral UL16 protein. *Journal of immunology* 171, 902-908.
- Romero, R., and Lavine, J.E. (1996). Cytokine inhibition of the hepatitis B virus core promoter. *Hepatology* 23, 17-23.
- Ryckman, B.J., Chase, M.C., and Johnson, D.C. (2008). HCMV gH/gL/UL128-131 interferes with virus entry into epithelial cells: evidence for cell type-specific receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 14118-14123.
- Sagedal, S., Nordal, K.P., Hartmann, A., Sund, S., Scott, H., Degre, M., Foss, A., Leivestad, T., Osnes, K., Fauchald, P., *et al.* (2002). The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2, 850-856.
- Saito, H., Kranz, D.M., Takagaki, Y., Hayday, A.C., Eisen, H.N., and Tonegawa, S. (1984). A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 312, 36-40.
- Sandstrom, A., Peigne, C.M., Leger, A., Crooks, J.E., Konczak, F., Gesnel, M.C., Breathnach, R., Bonneville, M., Scotet, E., and Adams, E.J. (2014). The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human Vgamma9Vdelta2 T cells. *Immunity* 40, 490-500.
- Sansoni, P., Vescovini, R., Fagnoni, F.F., Akbar, A., Arens, R., Chiu, Y.L., Cicin-Sain, L., Dechanet-Merville, J., Derhovanessian, E., Ferrando-Martinez, S., *et al.* (2014). New advances in CMV and immunosenescence. *Experimental gerontology* 55, 54-62.

Sato, M., Grasser, W., Endo, N., Akins, R., Simmons, H., Thompson, D.D., Golub, E., and Rodan, G.A. (1991). Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *The Journal of clinical investigation* 88, 2095-2105.

Scheper, W., van Dorp, S., Kersting, S., Pietersma, F., Lindemans, C., Hol, S., Heijhuurs, S., Sebestyen, Z., Grunder, C., Marcu-Malina, V., *et al.* (2013). gammadeltaT cells elicited by CMV reactivation after allo-SCT cross-recognize CMV and leukemia. *Leukemia* 27, 1328-1338.

Schleiss, M.R., Bourne, N., Stroup, G., Bravo, F.J., Jensen, N.J., and Bernstein, D.I. (2004). Protection against congenital cytomegalovirus infection and disease in guinea pigs, conferred by a purified recombinant glycoprotein B vaccine. *The Journal of infectious diseases* 189, 1374-1381.

Schmidt, A., Rutledge, S.J., Endo, N., Opas, E.E., Tanaka, H., Wesolowski, G., Leu, C.T., Huang, Z., Ramachandaran, C., Rodan, S.B., *et al.* (1996). Protein-tyrosine phosphatase activity regulates osteoclast formation and function: inhibition by alendronate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 3068-3073.

Schuessler, A., Walker, D.G., and Khanna, R. (2014). Cytomegalovirus as a novel target for immunotherapy of glioblastoma multiforme. *Frontiers in oncology* 4, 275.

Scotet, E., Martinez, L.O., Grant, E., Barbaras, R., Jenö, P., Guiraud, M., Monsarrat, B., Saulquin, X., Maillet, S., Esteve, J.P., *et al.* (2005). Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity* 22, 71-80.

Sell, S., Dietz, M., Schneider, A., Holtappels, R., Mach, M., and Winkler, T.H. (2015). Control of murine cytomegalovirus infection by gammadelta T cells. *PLoS pathogens* 11, e1004481.

Sester, U., Gartner, B.C., Wilkens, H., Schwaab, B., Wossner, R., Kindermann, I., Girndt, M., Meyerhans, A., Mueller-Lantzsch, N., Schafers, H.J., *et al.* (2005). Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 5, 1483-1489.

Sharp, L.L., Jameson, J.M., Cauvi, G., and Havran, W.L. (2005). Dendritic epidermal T cells regulate skin homeostasis through local production of insulin-like growth factor 1. *Nature immunology* 6, 73-79.

Sicard, H., Ingoure, S., Luciani, B., Serraz, C., Fournie, J.J., Bonneville, M., Tiollier, J., and Romagne, F. (2005). In vivo immunomanipulation of V gamma 9V delta 2 T cells with a synthetic phosphoantigen in a preclinical nonhuman primate model. *Journal of immunology* 175, 5471-5480.

Siewiera, J., El Costa, H., Tabiasco, J., Berrebi, A., Cartron, G., Le Bouteiller, P., and Jabrane-Ferrat, N. (2013). Human cytomegalovirus infection elicits new decidual natural killer cell effector functions. *PLoS pathogens* 9, e1003257.

Sijmons, S., Van Ranst, M., and Maes, P. (2014). Genomic and functional characteristics of human cytomegalovirus revealed by next-generation sequencing. *Viruses* 6, 1049-1072.

Sinclair, J. (2008). Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 41, 180-185.

Sinclair, J., and Sissons, P. (2006). Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *The Journal of general virology* 87, 1763-1779.

Sindhu, S.T.A.K., Ahmad, R., Morisset, R., Ahmad, A., and Menezes, J. (2003). Peripheral Blood Cytotoxic T Lymphocytes from Patients with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and AIDS Lyse Uninfected CD4+ T Cells, and Their Cytocidal Potential Correlates with Viral Load. *Journal of virology* 77, 1848-1855.

Skorey, K., Ly, H.D., Kelly, J., Hammond, M., Ramachandran, C., Huang, Z., Gresser, M.J., and Wang, Q. (1997). How does alendronate inhibit protein-tyrosine phosphatases? *The Journal of biological chemistry* 272, 22472-22480.

Smith, M.S., Goldman, D.C., Bailey, A.S., Pfaffle, D.L., Kreklywich, C.N., Spencer, D.B., Othieno, F.A., Streblow, D.N., Garcia, J.V., Fleming, W.H., *et al.* (2010). Granulocyte-colony stimulating factor reactivates human cytomegalovirus in a latently infected humanized mouse model. *Cell host & microbe* 8, 284-291.

Smith, R.M., Kosuri, S., and Kerry, J.A. (2014). Role of human cytomegalovirus tegument proteins in virion assembly. *Viruses* 6, 582-605.

Snydman, D.R., Werner, B.G., Heinze-Lacey, B., Berardi, V.P., Tilney, N.L., Kirkman, R.L., Milford, E.L., Cho, S.I., Bush, H.L., Jr., Levey, A.S., *et al.* (1987). Use of cytomegalovirus immune globulin to prevent cytomegalovirus disease in renal-transplant recipients. *The New England journal of medicine* 317, 1049-1054.

Soderberg-Naucler, C., and Johnsen, J.I. (2015). Cytomegalovirus in human brain tumors: Role in pathogenesis and potential treatment options. *World journal of experimental medicine* 5, 1-10.

Spencer, J.V., Lockridge, K.M., Barry, P.A., Lin, G., Tsang, M., Penfold, M.E.T., and Schall, T.J. (2002). Potent Immunosuppressive Activities of Cytomegalovirus- Encoded Interleukin-10. *Journal of virology* 76, 1285-1292.

Stein, J., Volk, H.D., Liebenthal, C., Kruger, D.H., and Prosch, S. (1993). Tumour necrosis factor alpha stimulates the activity of the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter in immature monocytic cells. *The Journal of general virology* 74 (Pt 11), 2333-2338.

Stern-Ginossar, N., Elefant, N., Zimmermann, A., Wolf, D.G., Saleh, N., Biton, M., Horwitz, E., Prokocimer, Z., Prichard, M., Hahn, G., *et al.* (2007). Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science* 317, 376-381.

Stresing, V., Fournier, P.G., Bellahcene, A., Benzaid, I., Monkkonen, H., Colombel, M., Ebetino, F.H., Castronovo, V., and Clezardin, P. (2011). Nitrogen-containing bisphosphonates can inhibit angiogenesis in vivo without the involvement of farnesyl pyrophosphate synthase. *Bone* 48, 259-266.

Sun, J.C., and Lanier, L.L. (2009). The Natural Selection of Herpesviruses and Virus-Specific NK Cell Receptors. *Viruses* 1, 362.

Sungur, C.M., Tang-Feldman, Y.J., Ames, E., Alvarez, M., Chen, M., Longo, D.L., Pomeroy, C., and Murphy, W.J. (2013). Murine natural killer cell licensing and regulation by T regulatory cells in viral responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 7401-7406.

Sylwester, A.W., Mitchell, B.L., Edgar, J.B., Taormina, C., Pelte, C., Ruchti, F., Sleath, P.R., Grabstein, K.H., Hosken, N.A., Kern, F., *et al.* (2005). Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *The Journal of experimental medicine* 202, 673-685.

Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., *et al.* (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3516-3521.

Tanaka, Y., Morita, C.T., Tanaka, Y., Nieves, E., Brenner, M.B., and Bloom, B.R. (1995). Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature* 375, 155-158.

Tanaka, Y., Sano, S., Nieves, E., De Libero, G., Rosa, D., Modlin, R.L., Brenner, M.B., Bloom, B.R., and Morita, C.T. (1994). Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 8175-8179.

Terrazzini, N., Bajwa, M., Vita, S., Cheek, E., Thomas, D., Seddiki, N., Smith, H., and Kern, F. (2014). A novel cytomegalovirus-induced regulatory-type T-cell subset increases in size during older life and links virus-specific immunity to vascular pathology. *The Journal of infectious diseases* 209, 1382-1392.

Thompson, K., Dunford, J.E., Ebetino, F.H., and Rogers, M.J. (2002). Identification of a bisphosphonate that inhibits isopentenyl diphosphate isomerase and farnesyl diphosphate synthase. *Biochemical and biophysical research communications* 290, 869-873.

Thompson, K., Rojas-Navea, J., and Rogers, M.J. (2006). Alkylamines cause Vgamma9Vdelta2 T-cell activation and proliferation by inhibiting the mevalonate pathway. *Blood* 107, 651-654.

Todaro, M., D'Asaro, M., Caccamo, N., Iovino, F., Francipane, M.G., Meraviglia, S., Orlando, V., La Mendola, C., Gulotta, G., Salerno, A., *et al.* (2009). Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes. *Journal of immunology* 182, 7287-7296.

Tokuyama, H., Hagi, T., Mattarollo, S.R., Morley, J., Wang, Q., So, H.F., Moriyasu, F., Nieda, M., and Nicol, A.J. (2008). V gamma 9 V delta 2 T cell cytotoxicity against tumor cells is enhanced by monoclonal antibody drugs--rituximab and trastuzumab. *International journal of cancer Journal international du cancer* 122, 2526-2534.

Tomasec, P., Braud, V.M., Rickards, C., Powell, M.B., McSharry, B.P., Gadola, S., Cerundolo, V., Borysiewicz, L.K., McMichael, A.J., and Wilkinson, G.W. (2000). Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 287, 1031.

Tomasec, P., Wang, E.C., Davison, A.J., Vojtesek, B., Armstrong, M., Griffin, C., McSharry, B.P., Morris, R.J., Llewellyn-Lacey, S., Rickards, C., *et al.* (2005). Downregulation of natural killer cell-activating ligand CD155 by human cytomegalovirus UL141. *Nature immunology* 6, 181-188.

Tomazin, R., Boname, J., Hegde, N.R., Lewinsohn, D.M., Altschuler, Y., Jones, T.R., Cresswell, P., Nelson, J.A., Riddell, S.R., and Johnson, D.C. (1999). Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4+ T cells. *Nature medicine* 5, 1039-1043.

Tomtishen, J.P., 3rd (2012). Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virology journal* 9, 22.

Toutirais, O., Cabillic, F., Le Friec, G., Salot, S., Loyer, P., Le Gallo, M., Desille, M., de La Pintiere, C.T., Daniel, P., Bouet, F., *et al.* (2009). DNAX accessory molecule-1 (CD226) promotes human hepatocellular carcinoma cell lysis by Vgamma9Vdelta2 T cells. *European journal of immunology* 39, 1361-1368.

Tsai, C.Y., Liong, K.H., Gunalan, M.G., Li, N., Lim, D.S., Fisher, D.A., MacAry, P.A., Leo, Y.S., Wong, S.C., Puan, K.J., *et al.* (2015). Type I IFNs and IL-18 regulate the antiviral response of primary human gammadelta T cells against dendritic cells infected with Dengue virus. *Journal of immunology* 194, 3890-3900.

Tu, W., Zheng, J., Liu, Y., Sia, S.F., Liu, M., Qin, G., Ng, I.H., Xiang, Z., Lam, K.T., Peiris, J.S., *et al.* (2011). The aminobisphosphonate pamidronate controls influenza pathogenesis by expanding a gammadelta T cell population in humanized mice. *The Journal of experimental medicine* 208, 1511-1522.

Uchida, R., Ashihara, E., Sato, K., Kimura, S., Kuroda, J., Takeuchi, M., Kawata, E., Taniguchi, K., Okamoto, M., Shimura, K., *et al.* (2007). Gamma delta T cells kill myeloma cells by sensing mevalonate metabolites and ICAM-1 molecules on cell surface. *Biochemical and biophysical research communications* 354, 613-618.

Vantourout, P., and Hayday, A. (2013). Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nature reviews Immunology* 13, 88-100.

Vantourout, P., Mookerjee-Basu, J., Rolland, C., Pont, F., Martin, H., Davrinche, C., Martinez, L.O., Perret, B., Collet, X., Perigaud, C., *et al.* (2009). Specific requirements for Vgamma9Vdelta2 T cell stimulation by a natural adenylated phosphoantigen. *Journal of immunology* 183, 3848-3857.

Vavassori, S., Kumar, A., Wan, G.S., Ramanjaneyulu, G.S., Cavallari, M., El Daker, S., Beddoe, T., Theodossis, A., Williams, N.K., Gostick, E., *et al.* (2013). Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human gammadelta T cells. *Nature immunology* 14, 908-916.

Venema, H., van den Berg, A.P., van Zanten, C., van Son, W.J., van der Giessen, M., and The, T.H. (1994). Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. *Journal of medical virology* 42, 188-192.

Vermijlen, D., Brouwer, M., Donner, C., Liesnard, C., Tackoen, M., Van Rysselberge, M., Twite, N., Goldman, M., Marchant, A., and Willems, F. (2010). Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero. *The Journal of experimental medicine* 207, 807-821.

Vermijlen, D., Ellis, P., Langford, C., Klein, A., Engel, R., Willmann, K., Jomaa, H., Hayday, A.C., and Eberl, M. (2007). Distinct Cytokine-Driven Responses of Activated Blood T Cells: Insights into Unconventional T Cell Pleiotropy. *The Journal of Immunology* 178, 4304-4314.

von Lilienfeld-Toal, M., Nattermann, J., Feldmann, G., Sievers, E., Frank, S., Strehl, J., and Schmidt-Wolf, I.G. (2006). Activated gammadelta T cells express the natural cytotoxicity receptor natural killer p 44 and show cytotoxic activity against myeloma cells. *Clinical and experimental immunology* 144, 528-533.

Wallace, M., Scharko, A.M., Pauza, C.D., Fisch, P., Imaoka, K., Kawabata, S., Fujihashi, K., Kiyono, H., Tanaka, Y., Bloom, B.R., *et al.* (1997). Functional gamma delta T-lymphocyte

defect associated with human immunodeficiency virus infections. *Molecular medicine* 3, 60-71.

Walter, E.A., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Finch, R.J., Watanabe, K.S., Thomas, E.D., and Riddell, S.R. (1995). Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *The New England journal of medicine* 333, 1038-1044.

Wang, D., and Shenk, T. (2005). Human cytomegalovirus UL131 open reading frame is required for epithelial cell tropism. *Journal of virology* 79, 10330-10338.

Wang, H., Henry, O., Distefano, M.D., Wang, Y.C., Raikonen, J., Monkkonen, J., Tanaka, Y., and Morita, C.T. (2013). Butyrophilin 3A1 plays an essential role in prenyl pyrophosphate stimulation of human Vgamma2Vdelta2 T cells. *Journal of immunology* 191, 1029-1042.

Wang, P., and Malkovsky, M. (2000). Different roles of the CD2 and LFA-1 T-cell co-receptors for regulating cytotoxic, proliferative, and cytokine responses of human V gamma 9/V delta 2 T cells. *Molecular medicine* 6, 196-207.

Watanabe, N., Narita, M., Yokoyama, A., Sekiguchi, A., Saito, A., Tochiki, N., Furukawa, T., Toba, K., Aizawa, Y., and Takahashi, M. (2006). Type I IFN-mediated enhancement of anti-leukemic cytotoxicity of gammadelta T cells expanded from peripheral blood cells by stimulation with zoledronate. *Cytotherapy* 8, 118-129.

Welte, S.A., Sinzger, C., Lutz, S.Z., Singh-Jasuja, H., Sampaio, K.L., Eknigk, U., Rammensee, H.G., and Steinle, A. (2003). Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *European journal of immunology* 33, 194-203.

Wesch, D., Beetz, S., Oberg, H.H., Marget, M., Krengel, K., and Kabelitz, D. (2006). Direct Costimulatory Effect of TLR3 Ligand Poly(I:C) on Human T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* 176, 1348-1354.

West, J.A., Gregory, S.M., and Damania, B. (2012). Toll-like receptor sensing of human herpesvirus infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2, 122.

Wiertz, E.J., Jones, T.R., Sun, L., Bogoy, M., Geuze, H.J., and Ploegh, H.L. (1996). The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* 84, 769-779.

Wilkinson, G.W., Davison, A.J., Tomasec, P., Fielding, C.A., Aicheler, R., Murrell, I., Seirafian, S., Wang, E.C., Weekes, M., Lehner, P.J., *et al.* (2015). Human cytomegalovirus: taking the strain. *Medical microbiology and immunology* 204, 273-284.

Willcox, C.R., Pitard, V., Netzer, S., Couzi, L., Salim, M., Silberzahn, T., Moreau, J.F., Hayday, A.C., Willcox, B.E., and Dechanet-Merville, J. (2012). Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nature immunology* 13, 872-879.

Wu, L., Mashego, M.R., van Dam, J.C., Proell, A.M., Vinke, J.L., Ras, C., van Winden, W.A., van Gulik, W.M., and Heijnen, J.J. (2005). Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass spectrometry using uniformly ¹³C-labeled cell extracts as internal standards. *Anal Biochem* 336, 164-171.

Wu, Y.L., Ding, Y.P., Tanaka, Y., Shen, L.W., Wei, C.H., Minato, N., and Zhang, W. (2014). gammadelta T cells and their potential for immunotherapy. *International journal of biological sciences* 10, 119-135.

Wu, Z., Frascaroli, G., Bayer, C., Schmal, T., and Mertens, T. (2015). Interleukin-2 from Adaptive T Cells Enhances Natural Killer Cell Activity against Human Cytomegalovirus-Infected Macrophages. *Journal of virology* 89, 6435-6441.

Xiang, Z., Liu, Y., Zheng, J., Liu, M., Lv, A., Gao, Y., Hu, H., Lam, K.T., Chan, G.C., Yang, Y., *et al.* (2014). Targeted activation of human Vgamma9Vdelta2-T cells controls epstein-barr virus-induced B cell lymphoproliferative disease. *Cancer cell* 26, 565-576.

Yager, E.J., Szaba, F.M., Kummer, L.W., Lanzer, K.G., Burkum, C.E., Smiley, S.T., and Blackman, M.A. (2009). gamma-Herpesvirus-induced protection against bacterial infection is transient. *Viral immunology* 22, 67-72.

Ye, J., Wang, C., Sumpter, R., Jr., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Gale, M., Jr. (2003). Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15865-15870.

Yu, D., Silva, M.C., and Shenk, T. (2003). Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 12396-12401.

Yuasa, T., Sato, K., Ashihara, E., Takeuchi, M., Maita, S., Tsuchiya, N., Habuchi, T., Maekawa, T., and Kimura, S. (2009). Intravesical administration of gammadelta T cells successfully prevents the growth of bladder cancer in the murine model. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 58, 493-502.

Zhou, W., Longmate, J., Lacey, S.F., Palmer, J.M., Gallez-Hawkins, G., Thao, L., Spielberger, R., Nakamura, R., Forman, S.J., Zaia, J.A., *et al.* (2009). Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood* 113, 6465-6476.

TITLE :

Antiviral properties of human V γ 9V δ 2 T cells:
Immunotherapeutic potential during human cytomegalovirus infection

ABSTRACT :

Aminobisphosphonates (ABP) treatment of cells induces intracellular accumulation of molecules (IPP, Apppl) which stimulate human V γ 9V δ 2 T cells. Although these lymphocytes do not appear naturally activated during human cytomegalovirus (HCMV) infection, the laboratory demonstrated a synergistic effect of HCMV and ABP on V γ 9V δ 2 T cell activation. My PhD thesis aimed to analyze the mechanism of this synergy and evaluate the immunotherapeutic potential of ABP in the context of HCMV infection.

After ABP treatment of cells *in vitro*, we showed that HCMV-infected cells strongly activated V γ 9V δ 2 T cells. ABP-treated fibroblasts activate V γ 9V δ 2 T cells to produce IFN- γ but not TNF. The HCMV infection of these fibroblasts stimulates TNF secretion and an increased production of IFN- γ , indicating that V γ 9V δ 2 cells can sense HCMV infection. Increased cytokine production was observed with V γ 9V δ 2 T cell lines and “fresh” V γ 9V δ 2 directly isolated of blood. Moreover, V γ 9V δ 2 T cell activation was observed with most HCMV strains (laboratory strains or clinical isolates) and different HCMV-permissive cells. We also showed that HCMV infection induces an overproduction of IPP and Apppl in ABP-treated cells, which explains in part the increased cytokine production by V γ 9V δ 2 T cells. At last, we demonstrated the capacity of V γ 9V δ 2 T cells to limit viral replication and production after ABP treatment while preserving uninfected cells. Our experiments indicate that this antiviral activity involves IFN- γ and TNF secretion by V γ 9V δ 2 T cells but not their cytotoxicity activity.

Consequently, my work provides a proof of concept of the therapeutic potential of ABP in the context of HCMV infection.

AUTEUR : Charline DAGUZAN

TITRE : Analyse des propriétés antivirales des lymphocytes T V γ 9V δ 2 humains :
Potentiel immuno-thérapeutique au cours des infections par le Cytomégalovirus humain

DIRECTEUR DE THESE : Dr Eric CHAMPAGNE

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Hôpital Purpan Toulouse, le 15 décembre 2015

RESUME :

Le traitement de cellules par des aminobisphosphonates (ABP) induit une accumulation intracellulaire de molécules activatrices des lymphocytes T V γ 9V δ 2 (IPP, Apppl). Alors que ces lymphocytes ne semblent pas naturellement activés lors d'une infection par le cytomégalovirus humain (HCMV), le laboratoire a mis en évidence l'existence d'une action synergique entre le HCMV et les ABP sur leur activation. Ma thèse a eu pour objectif d'analyser le mécanisme de cette synergie et d'évaluer le potentiel immuno-thérapeutique des ABP dans le cadre d'une infection HCMV.

Nous avons montré qu'après sensibilisation par des ABP *in vitro*, des cellules infectées sont fortement activatrices des T V γ 9V δ 2. Les fibroblastes traités par des ABP activent la production d'IFN- γ par les T V γ 9V δ 2 mais pas la production de TNF. L'infection de ces fibroblastes par le HCMV induit une augmentation de la production d'IFN- γ et stimule la production de TNF par des T V γ 9V δ 2. Cette activation a été observée avec des lymphocytes T V γ 9V δ 2 établis en lignées cellulaires mais aussi avec des cellules V γ 9V δ 2 isolées directement de sang périphérique. De plus, cette augmentation de production de cytokines est observée avec différentes souches virales (souche de laboratoire et isolats cliniques) et différents types cellulaires permissifs pour HCMV. Nous avons également montré que l'infection par le HCMV entraîne une surproduction d'IPP et d'Apppl dans les cellules cibles traitées aux ABP, ce qui explique en partie l'augmentation de la sécrétion de cytokines par les T V γ 9V δ 2. Enfin, nous avons mis en évidence que ces T V γ 9V δ 2 sont capables de limiter la réplication et la production virale suite à un traitement par des ABP, tout en préservant les cellules non infectées. Selon nos études, cette activité antivirale implique la production des cytokines IFN- γ et TNF et non l'activité cytotoxique des T V γ 9V δ 2.

Par conséquent, mes travaux de thèse fournissent une preuve de concept pour une application thérapeutique des ABP dans le cadre d'une infection par le HCMV.

MOTS-CLES : Lymphocytes T $\gamma\delta$; Cytomégalovirus humain ; Aminobisphosphonates

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Immunologie - Virologie

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

INSERM UMR1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP)

Equipe 8 «Infections virales : persistance, réponse de l'hôte et physiopathologie»

Bâtiment B. 4ème étage, CHU Purpan – BP 3028, 31024 Toulouse Cedex 3